

وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
مؤسسه تحقیقات شیلات ایران - انستیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری دکتر دادمان

عنوان:

بررسی امکان تفکیک تاسماهی ایرانی
و تاسماهی روسی با استفاده از تکنیکهای
سیتوژنتیک مولکولی

مجری:

محمدرضا نوروز فشخامی

وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
مؤسسه تحقیقات شیلات ایران - انستیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری دکتر دادمان

-
- عنوان پروژه/ طرح: بررسی امکان تفکیک تاسماهی ایرانی و تاسماهی روسی با استفاده از تکنیکهای سیتوژنتیک مولکولی
- شماره مصوب: ۸۴۰۲۸-۰۳-۰۰۰-۲۰۰۰۰-۲۰۲۵-۲
- نام و نام خانوادگی نگارنده/ نگارنده‌گان: محمدرضا نوروز فشخامی
- نام و نام خانوادگی مجری مسئول (اختصاص به پروژه‌ها و طرحهای ملی و مشترک دارد):
- نام و نام خانوادگی مجری/ مجریان: محمدرضا نوروز فشخامی
- نام و نام خانوادگی همکاران: محمدپور کاظمی - محمد حسن زاده صابر - مهتاب یارمحمدی
- نام و نام خانوادگی مشاور(ان): بهرام کاظمی - فروزنده محجوبی
- محل اجرا: استان گیلان
- تاریخ شروع: ۸۴/۵/۱
- مدت اجرا: ۴ سال و ۲ ماه
- ناشر: مؤسسه تحقیقات شیلات ایران
- شمارگان (تیراژ): ۲۰ نسخه
- تاریخ انتشار: سال ۱۳۸۹
حق چاپ برای مؤلف محفوظ است - نقل مطالب تصاویر، جداول، منحنی‌ها و نمودارها با ذکر مأخذ بلامانع است.

«سوابق طرح یا پروژه و مجری»

طرح / پروژه: بررسی امکان تفکیک تاسماهی ایرانی و تاسماهی روسی با استفاده از
تکنیکهای سیتوژنتیک مولکولی
کد مصوب: ۸۴۰۲۸-۰۳-۰۰۰-۲۰۰۰۰-۲۰۲۵-۲

شماره ثبت (فروست): ۸۹/۵۹

با مسئولیت اجرایی جناب آقای محمدرضا نوروز فشخامی دارای مدرک تحصیلی
کارشناسی ارشد در رشته بیولوژی ماهیان دریا می باشد.

طرح/پروژه توسط داوران منتخب بخش زیست فناوری و فرآوری
آبزیان در تاریخ ۱۳۸۸/۱۲/۱۱ مورد ارزیابی و با نمره ۱۴ و رتبه متوسط
تأیید گردید.

در زمان اجرای طرح یا پروژه، مجری در:

ستاد ☐ پژوهشکده ☐ مرکز ☒ ایستگاه ☐

با سمت رئیس بخش فناوری زیستی و ژنتیک انستیتو تحقیقات بین المللی ماهیان
خاویاری دکتر دادمان مشغول بوده است.

به نام خدا

عنوان	«فهرست مندرجات»	صفحه
چکیده		۱
مقدمه		۲
۱- کلیات		۳
۱-۱- خانواده تاسماهیان (ماهیان خاویاری)		۳
۱-۱-۱- تاسماهی ایرانی		۴
۱-۱-۲- تاسماهی روسی		۷
۱-۱-۳- کاریوتایپ تاسماهیان		۱۰
۱-۱-۴- DNA ژنومی تاسماهیان		۱۲
۱-۲- مروری بر منابع		۱۳
۱-۲-۱- بررسیهای تاکسونومیک تاسماهی ایرانی و تاسماهی روسی در خارج کشور		۱۳
۱-۲-۲- بررسیهای تاکسونومیک تاسماهی ایرانی و تاسماهی روسی در داخل کشور		۱۵
۱-۳- تکنیک (FISH) Fluorescent In Situ Hybridization		۱۶
۱-۳-۱- کاربردهای تکنیک FISH در ماهیان		۱۷
۱-۳-۲- مراحل مختلف آزمایشهای FISH		۱۹
۲- دلایل و اهداف طرح		۲۱
۳- روش کار		۲۳
۳-۱- تهیه گسترشهای کروموزومی ماهیان مورد آزمایش از طریق کشت گلبولهای سفید خون		۲۴
۳-۲- آزمایشات انجام شده در ارتباط با تهیه پروب (SatDNA خویشاوندی تاسماهیان)		۲۶
۳-۳- کلونینگ قطعه SatDNA (۱۷۰bp) تهیه شده		۲۸
۳-۴- هیبریداسیون پروبهای نشاندار شده با کروموزومهای تاسماهی ایرانی و تاسماهی روسی (آزمایشات FISH)		۳۱
۴- نتایج		۳۵
۴-۱- نتایج کسب شده در کشت خون ماهیان مورد آزمایش		۳۵
۴-۲- نتایج مربوط به تهیه پروب		۳۸
۴-۳- نتایج مربوط به کلونینگ		۴۰
۴-۴- نتایج مربوط به هیبریداسیون پروب با کروموزومهای ماهیان مورد آزمایش (آزمایشات FISH)		۴۴

عنوان	«فهرست مندرجات»	صفحه
۵- بحث	۴۶
پیشنهاها	۵۴
منابع	۵۶
چکیده انگلیسی	۶۰

MINISTRY OF JIHAD - E - AGRICULTURE
AGRICULTURAL RESEARCH, EDUCATION & EXTENTION ORGANIZATION
IRANIAN FISHERIES RESEARCH ORGANIZATION- INTERNATIONAL
STURGEON RESEARCH INSTITUTE

Title:

Investigation on possibility of Separation of *Acipenser persicus* and *Acipenser gueldenstaedtii* using molecular cytogenetics techniques

Executor :

Mohammadreza Nowruzfashkhami

Registration Number

2010.59

Ministry of Jihad – e – Agriculture
AGRICULTURAL RESEARCH, EDUCATION & EXTENTION ORGANIZATION
IRANIAN FISHERIES RESEARCH ORGANIZATION – INTERNATIONAL
STURGEON RESEARCH INSTITUTE-RASHT

Title : Investigation on possibility of Separation of *Acipenser persicus* and *Acipenser gueldenstaedtii* using molecular cytogenetics techniques

Apprpved Number:2-025-200000-03-000-84028

Author: Mohammadreza Nowruzfashkhami

Executor : Mohammadreza Nowruzfashkhami

Collaborator(s) : M. Pourkazemi , M. Hassanzadeh saber, M.Yarmohammadi

Advisor(s): B. Kazemi, F. Mahjoubi

Location of execution : Guilan province

Date of Beginning : 2005

Period of execution :4 Years & 2 Months

Publisher : *Iranian Fisheries Research Organization*

Circulation : 20

Date of publishing : 2010

All Right Reserved . No Part of this Publication May be Reproduced or Transmitted without indicating the Original Reference

چکیده

در این تحقیق محل استقرار DNA ماهواره ای (*HindIII* SatDNA) بر روی کروموزومهای تاسماهی ایرانی و تاسماهی روسی با استفاده از تکنیک (FISH) Fluorescent In Situ Hybridization به منظور دستیابی به اختلافات ژنتیکی بین این دو گونه بررسی شد.

پس از تهیه گسترشهای کروموزومی مناسب با استفاده از روش کشت خون و استخراج SatDNA مذکور از ژنوم ماهیان مورد آزمایش، SatDNA جدا شده از ژنوم تاسماهی روسی به عنوان پروب FISH استفاده شد. پروب مورد نظر پس از نشانگذاری با ماده Spectrum orange (Orange-dUTP) با کروموزومهای ماهیان مورد مطالعه هیبرید گردید.

بررسی توالی SatDNA جدا شده از تاسماهی ایرانی و تاسماهی روسی حاکی از وجود به ترتیب ۱۶۳ جفت باز (۱۶۳bp) و ۱۶۸ جفت باز (۱۶۸bp) در آنها بود. در نتیجه بررسی متافازها تعداد 66 ± 4 عدد علامت حاصل از هیبریداسیون پروب مورد استفاده با کروموزومهای تاسماهی ایرانی و تعداد 68 ± 3 عدد علامت حاصل از هیبریداسیون پروب مورد استفاده با کروموزومهای تاسماهی روسی رویت گردید. به علت وجود تعداد زیادی میکروکروموزوم، ناهمگن و بزرگ بودن علایم حاصل از هیبریداسیون تشخیص و تعیین محل دقیق قرار گرفتن علایم مذکور بر روی کروموزومهای ماهیان مورد آزمایش میسر نشد.

از دستاوردهای این تحقیق می توان به موارد ذیل اشاره نمود :

- ۱- بدست آوردن روش کشت خون تاسماهی روسی و تکمیل روش کشت بافت خون در مورد تاسماهیان دریای خزر
- ۲- بدست آوردن ترکیب مناسب محیط کشت مورد نیاز برای کشت خون تاسماهیان دریای خزر
- ۳- استخراج *HindIII* SatDNA از تاسماهی ایرانی و تاسماهی روسی، تعیین توالی و ثبت توالی آن در بانک ثبت ژن (NCBI) با کدهای (FJ429174) و (FJ594465).

- ۴- بدست آوردن روش کار مربوط به انجام آزمایشات FISH در مورد تاسماهی ایرانی و تاسماهی روسی، با دستیابی به مراحل روش کار تکنیک FISH در واقع فصل جدیدی در تحقیقات ژنتیک آبزیان کشورمان تحت عنوان سیتوژنتیک مولکولی آبزیان گشوده شد و با توجه به کاربردهای مختلف این تکنیک، می توان از این تکنیک برای سایر آبزیان بهره جست.

واژگان کلیدی: دریای خزر، تاسماهی ایرانی، تاسماهی روسی، (FISH) Fluorescent in situ Hybridization ،

HindIII SatDNA

مقدمه

بدست آوردن اطلاعات ژنتیکی از طریق بکارگیری روشهای رایج ژنتیک مولکولی، سیتوژنتیک و سیتوژنتیک مولکولی علاوه بر حفاظت و بازسازی ذخایر برای بررسی روابط تاکسونومیک و فیلوژنتیک ماهیان مختلف می تواند کاربرد داشته باشد.

پیدایش تکنیک^۱ FISH و بکارگیری آن از دهه ۱۹۹۰ علاوه بر کسب تجربیات عالی و تلفیق دانستیهای ژنتیک مولکولی و سیتوژنتیک و بوجود آمدن سیتوژنتیک مولکولی، امکان بررسی روابط تاکسونومیک و فیلوژنتیک موجودات مختلف از جمله ماهیان را فراهم نموده است. بررسی جایگاه یک قطعه DNA ماهواره ای (SatDNA)^۲ خویشاوندی بر روی کروموزومهای تعدادی از تاسماهیان با استفاده از این تکنیک نیز ابزار خوبی را برای بررسی رابطه فیلوژنی آنها مهیا نمود.

علیرغم بررسی جایگاه SatDNA مذکور در کروموزومهای چندین گونه از تاسماهیان از جمله تاسماهی روسی، وجود یا عدم وجود، همچنین محل استقرار آن بر روی کروموزومهای تاسماهی ایرانی بررسی نگردیده است. از طرفی با توجه به اختلاف عقیده موجود بین محققین مختلف مبنی بر استقلال گونه ای تاسماهی ایرانی از تاسماهی روسی، این طرح تحقیقاتی پیشنهاد و انجام شد. در این طرح تلاش گردید علاوه بر دستیابی به مراحل مختلف روش کار تکنیک FISH و بهینه سازی آن، جایگاه SatDNA خویشاوندی تاسماهیان نیز در کروموزومهای تاسماهی ایرانی و تاسماهی روسی بررسی گردد تا شاید بتوان از این طریق به تفاوتی که نشان دهنده استقلال گونه ای تاسماهی ایرانی از تاسماهی روسی باشد دست یافت.

^۱Flourescent In Situ Hybridization

^۲Satellite

۱- کلیات

۱-۱- معرفی تاسماهیان خانواده تاسماهیان (ماهیان خاویاری) ۱۸۳۲, Acipenseridae Bonapart

ماهیان خاویاری به واسطه تولید خاویار یکی از مهمترین ماهیان تجاری جهان محسوب می شوند. تاسماهیان همراه با یک خانواده دیگر به نام کفچه ماهیان (Polyodontidae) و یک خانواده فسیلی از بین رفته (Chondrosteidae) متعلق به راسته تاسماهی شکلان (Acipenseriformes)، رده Osteichthys و شاخه Chordata می باشد.

ماهیهای خاویاری در سرتاسر نیمکره شمالی، شمال و شرق آسیا، اروپا و امریکای شمالی پراکنده هستند. با توجه به زیستگاهها، این ماهیها را به دو گروه ماهیهای خاویاری آبهای شیرین و ماهیهای خاویاری مهاجر رودکوچ تقسیم می کنند که گروه دوم بیشتر زندگی تغذیه ای و رشد و نمو خود را در دریا سپری می کنند و پس از رسیدن به سن بلوغ به رودخانه های محل تخمیزی خود مهاجرت می کنند. گروه سومی نیز به شکل نیمه مهاجر وجود دارد که وارد آبهای نیمه شور، مصب رودخانه ها و رودخانه های محل زندگی خود می شوند ولی بندرت فراتر از آن می روند (کیوان، ۱۳۸۲).

خانواده تاسماهیها به دو زیرخانواده تاسماهیها (Acipenserinae) و تاسماهیهای پاروپوزه (Scaphirhynchinae) تقسیم می شود. مشخصات افتراقی آنها وجود اسپیراکولوم و آبشش کاذب در زیرخانواده اولی و فقدان این دو در زیرخانواده دومی است. در عوض در زیرخانواده دوم یک زایده در انتهای شاخه بالایی باله دمی وجود دارد که این زایده در زیر خانواده اول وجود ندارد.

زیرخانواده تاسماهیان (Acipenserinae)

زیرخانواده تاسماهیان دارای دو جنس تاسماهیان (Acipenser) و فیل ماهیان (Huso) است (بهمنی، ۱۳۷۷؛ کیوان، ۱۳۸۲).

جنس تاسماهیان

غشای زیرچانه ای به شکافهای بین کمانهای آبششی چسبیده و چین خوردگی غشایی آزاد بین آنها وجود ندارد، شکاف دهان متوسط و به طور عرضی در زیر سر قرار دارد. پوزه مخروطی یا شمشیری، سبیلکها تقریباً استوانه ای و مقطع آنها گرد است.

در حال حاضر از بین ۱۸ گونه متعلق به جنس مزبور، ۵ گونه ماهی شپ *Acipenser nudiventris*، تاسماهی ایرانی *Acipenser persicus*، تاسماهی روسی *Acipenser gueldenstedtii*، ماهی ازون برون *Acipenser stellatus* و ماهی استرلیاد *Acipenser ruthenus* در دریای خزر زندگی می کنند.

۱-۱-۱- تاسماهی ایرانی (*Acipenser persicus* Brodin, 1897)

نظر به اینکه این گونه بیشتر در سواحل جنوبی دریای خزر و محدوده آبهای ایران زندگی می کند به Persian sturgeon با نام علمی *Acipenser persicus* شهرت یافته است (Holcik, ۱۹۸۹).

۱-۱-۱-۱- مورفولوژی

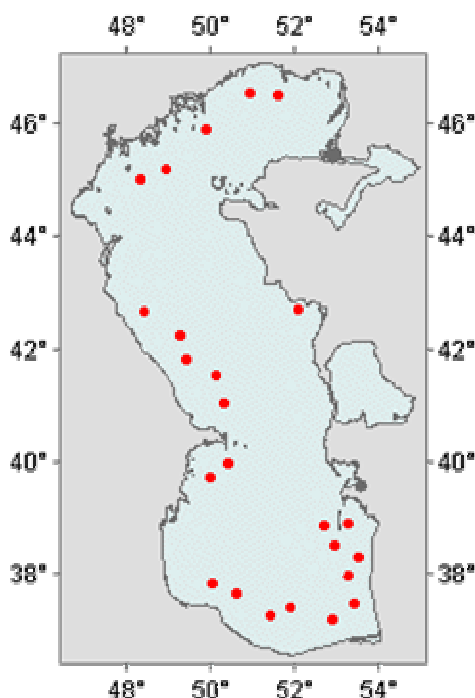
تاسماهی ایرانی دارای بدنی کشیده، باریک و پوزه تیز است که ارتفاع سر ۱۷/۲ درصد طول کل بدن را تشکیل می دهد. باله سینه ای آن نسبتاً کوچک است. طول سر در نمونه هایی که بررسی شده اند ۱۱/۱ تا ۲۶/۸ درصد و طول پوزه ۶/۱ تا ۷ درصد طول کل بدن است. دهان در این گونه تحتانی و به شکل یک شکاف عرضی قرار دارد. پهنای دهان ۲۴ الی ۳۶ درصد طول سر در نمونه کورا بوده است. پشت بدن ماهی خاکستری سفید یا آبی متمایل به خاکستری با درخشش آبی فولادی در پهلوهاست. بخش شکمی آن سفید می باشد. نمونه های این گونه در دریای سیاه دارای رنگ تیره تر هستند (Borodin, ۱۸۹۷؛ برگرفته از Holcik, ۱۹۸۹).



شکل ۱- تاسماهی ایرانی

۲-۱-۱-۱-۲- پراکنش

این گونه عمدتاً در حوضه دریای خزر انتشار دارد. تاسماهی ایرانی در تمام قسمتهای دریای خزر انتشار دارد اما تغذیه و زمستان گذرانی خود را در قسمتهای مرکزی و جنوبی دریای خزر انجام می دهد. این ماهی برای تخمیزی وارد رودخانه های کورا، ولگا، ارال و بندرت وارد سایر رودخانه ها نظیر ترک، سولاک و سامور نیز می شود (Holcik, ۱۹۸۹). تحقیقات انجام شده حضور تاسماهی ایرانی در دریای سیاه را نیز تایید نمود. نمونه هایی از این ماهی در رودخانه Rioni در حوزه قفقاز، همچنین رودخانه های کوهستانی قفقاز و در امتداد ساحل ترکیه نیز یافت شده اند (Holcik, ۱۹۸۹).



شکل ۲- پراکنش تاسماهی ایرانی در دریای خزر

(اقتباس از [www.Caspian Environment Progamme.org](http://www.Caspian_Environment_Programme.org))

۳-۱-۱-۱-۱-۳- طول عمر و بلوغ جنسی

بیشترین طول عمر تاسماهی ایرانی صید شده در آبهای جمهوری اسلامی ایران با طول فورک در حدود ۲۳۹ سانتیمتر و وزن ۱۳۴ کیلو گرم ۴۰ سال گزارش شده است (توکلی و همکاران، ۱۳۸۷). تاسماهی ایرانی اندکی دیرتر از تاسماهی روسی به سن بلوغ می رسد. ماهیان نر در سن ۱۵-۸ و ماهیان ماده در سن ۱۸-۱۲ سال به سن

بلوغ می رسند. تاسماهی ایرانی هر ساله تخمیزی نمی کند و فاصله هر تخمیزی با تخمیزی بعدی کمتر از ۲ یا ۴ سال نیست (Holcik, ۱۹۸۹).

۴-۱-۱-۱- کاربوتایپ

تعداد کروموزومهای تاسماهی ایرانی $2n=258 \pm 4$ گزارش شده است. در کاربوتایپ تهیه شده از این ماهی ($2n=262$) جفت کروموزوم متاسانتریک و ساب متاسانتریک و ۶۴ جفت کروموزوم اکروسانتریک و میکروکروموزوم تشخیص داده شد (Nowruzfashkhami et al., 2000).

۵-۱-۱-۱- ارزش اقتصادی

تاسماهی ایرانی مانند سایر تاسماهیان به خاطر تولید گوشت و خاویار لذیذ و گرانبها دارای ارزش اقتصادی زیادی است. بر اساس آمار دهساله شیلات ایران (۱۳۷۸-۱۳۸۷) تاسماهی ایرانی ۶۰/۲۶ درصد کل گوشت و ۶۶/۶۶ درصد کل خاویار در صید کشورمان را به خود اختصاص داده است (جدول ۱). طبق بررسیهای انجام شده علیرغم تکثیرمصنوعی و رهاکرد میانگین تعداد ۱۲ میلیون عدد بچه تاسماهی ایرانی طی ۱۰ سال توسط کشورمان (جدول ۲)، میزان صید تاسماهی ایرانی مانند سایر تاسماهیان رو به کاهش است (جدول ۳).

جدول ۱- درصد میزان صید، استحصال خاویار و گوشت تاسماهی

ایرانی در آبهای ایران طی سالهای ۱۳۸۷-۱۳۷۸

سال	۱۳۷۸	۱۳۷۹	۱۳۸۰	۱۳۸۱	۱۳۸۲	۱۳۸۳	۱۳۸۴	۱۳۸۵	۱۳۸۶	۱۳۸۷	میانگین
صید	۴۷/۶	۵۴/۲	۶۴/۲	۶۵/۵	۶۸/۳	۶۹/۳	۶۴/۱	۶۰/۹	۶۰/۸	۵۴/۵	۶۰/۹۴
گوشت	۴۷/۴	۵۳/۸	۶۳/۹	۶۵/۱	۶۸	۶۸	۶۳/۴	۵۸/۹	۵۹/۳	۵۴/۸	۶۰/۲۶
خاویار	۵۰/۱	۵۷/۶	۶۶	۶۸/۴	۷۳/۸	۷۶/۳	۷۳/۷	۶۹/۶	۶۹/۶	۶۱/۵	۶۶/۶۶

جدول ۲- آمار رهاکرد بچه ماهیان تاسماهی ایرانی حاصل از تکثیر

مصنوعی در آبهای ایران طی سالهای ۱۳۸۷-۱۳۷۸ (میلیون عدد)

سال	۱۳۷۸	۱۳۷۹	۱۳۸۰	۱۳۸۱	۱۳۸۲	۱۳۸۳	۱۳۸۴	۱۳۸۵	۱۳۸۶	۱۳۸۷	میانگین
تعداد	۱۷/۳	۱۳/۷۸	۱۶/۲۷۹	۱۲/۳۰۱	۱۳	۱۲/۵۹	۹/۹۴۲	۱۲/۲۰۹	۱۰/۳۴۸	۶/۱۴۱	۱۲/۳۸۹

جدول ۳- میزان صید، استحصال خاویار و گوشت تاسماهی ایرانی در
آبهای ایران طی سالهای ۱۳۸۷-۱۳۷۸ (برحسب تن)

سال	۱۳۷۸	۱۳۷۹	۱۳۸۰	۱۳۸۱	۱۳۸۲	۱۳۸۳	۱۳۸۴	۱۳۸۵	۱۳۸۶	۱۳۸۷
صید	۴۳۹/۹۰۳	۴۴۸/۴۶	۵۶۴/۶۵۱	۴۴۸/۱۶	۳۴۹/۱۰۴	۱۹۷/۷۷	۱۰۸/۴۴۶	۸۳/۷۲۴	۵۸/۴۹	۳۶/۲
گوشت	۳۳۸/۳۸۷	۳۴۴/۹۶۹	۴۳۴/۳۴۷	۳۴۴/۷۴	۲۶۷/۷۲۳	۱۳۵/۲۵۹	۸۳/۴۲	۶۰/۱۴۴	۴۳/۲۵۴	۲۷/۸۰۲
خاویار	۴۸/۷۳۲	۵۳/۱۳۶	۵۸/۸۷۹	۴۶/۲۷	۳۷/۲۵۳	۲۰/۳۲۵	۱۳/۵۶۲	۱۰/۷۶۲	۷/۲۷۵	۴/۳۵۷

۲-۱-۱- تاسماهی روسی (*Acipenser gueldenstaedti* Brandt, 1833)

۱-۲-۱- مورفولوژی

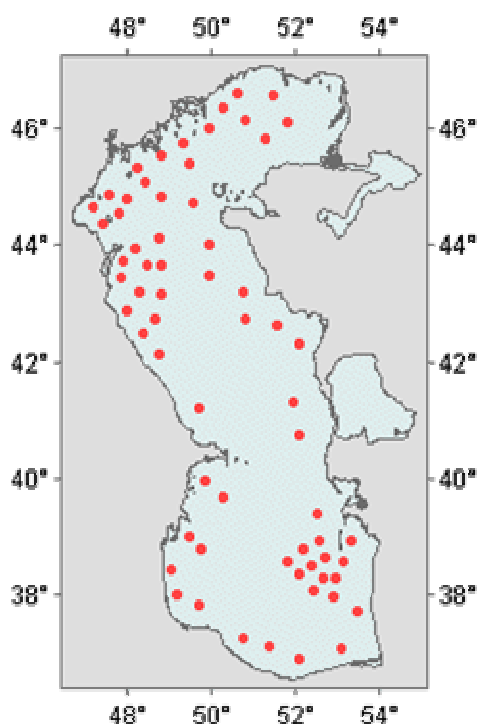
تاسماهی روسی دارای بدنی کشیده و دوکی شکل می باشد. میانگین ارتفاع بدن ۱۲ تا ۱۴ درصد و ارتفاع سر ۱۷ تا ۱۹ درصد طول کل بدن را تشکیل می دهد. پوزه کوتاه، پهن و اندکی گرد می باشد. سیبکها به نوک پوزه نزدیکتر از دهان می باشند. دهان مورب، برجسته و تقریباً کوچک و در نمونه کورا پهنای آن ۳۰/۸ درصد طول سر می باشد. در وسط لب پایینی دهان یک شکاف میانی وجود دارد. رنگ بندی بدن متغیر است بطوریکه پشت آن خاکستری متمایل به سیاه، سبز کثیف یا سبز تیره، پهلوها معمولاً قهوه ای متمایل به خاکستری و بخش شکمی آن خاکستری و بندرت زرد لیمویی می باشد (Holcik, ۱۹۸۹).

شکل ۳- تاسماهی روسی



۲-۲-۱-۱- پراکنش

این گونه در دریای خزر، دریای سیاه، آزوف و رودخانه های منتهی به آن انتشار دارد. تعداد اندکی از آنها وارد رودخانه های سامور، کورا، آستارا در امتداد سواحل جنوبی دریای خزر می گردد (Holcik, ۱۹۸۹). بیشتر ذخایر تاسماهی روسی وابسته به رودخانه ولگا می باشد و بطور عمده در بخش شمالی دریای خزر به سر می برد (نقشه ۲) ولی پراکنش آن در آبهای جنوبی این دریا نیز قابل ملاحظه است (کیوان، ۱۳۸۲).



شکل ۴- پراکنش تاسماهی روسی در دریای خزر

(اقتباس از [www.Caspian Environment Programme.Org](http://www.Caspian_Environment_Programme.Org))

۳-۱-۲-۱- طول عمر و بلوغ جنسی

این ماهی می تواند بیش از ۵۰ سال عمر کند. بزرگترین تاسماهی روسی صید شده در آبهای ایران ۳۷ سال سن با طول فورک ۲۱۷ سانتیمتر و وزن ۱۳۸ کیلوگرم گزارش شده است (مقیم و همکاران، ۱۳۸۳). تاسماهی روسی اندکی زودتر از تاسماهی ایرانی به سن بلوغ می رسد. سن بلوغ در تاسماهی روسی در رودخانه های مختلف فرق می کند. نرها در سن ۱۱ تا ۱۳ سالگی و ماده ها در سن ۱۲ تا ۱۶ سالگی به سن بلوغ می رسند. تاسماهیان روسی رودخانه آزوف ظاهراً ۲-۱ سال زودتر از دیگر جمعیتها به سن بلوغ می رسند. تاسماهی روسی هر ساله تخمیزی نمی کند و فاصله هر تخمیزی با تخمیزی بعدی ۴ تا ۵ سال می باشد.

۴-۲-۱-۱- کارپو تایپ

تعداد کروموزومهای تاسماهی روسی $2n=250 \pm 8$ و تعداد بازوهای کروموزومی آن $NF=342 \pm 12$ گزارش گردید. در کارپو تایپ تهیه شده از این ماهی 92 ± 4 جفت کروموزوم متاسانتريک و ساب متاسانتريک و بقیه اکروسانتريک یا ساب تلوسانتريک بودند. میکروکروموزومها نیز $1/2$ تا $1/3$ تعداد کل کروموزومها را تشکیل می دادند (Vasiliev و Birstein, ۱۹۸۷).

۵-۲-۱-۱- ارزش اقتصادی

با توجه به اینکه تاسماهی روسی نسبت به تاسماهی ایرانی آبهای سردتر را ترجیح می دهد لذا میزان ذخایر و صید آن در شمال دریای خزر همواره بیش از قسمتهای جنوبی این دریا می باشد.

بر اساس آمار دهساله شیلات ایران (۱۳۷۸-۱۳۸۷) میزان صید این ماهی توسط کشورمان نسبت به تاسماهی ایرانی بسیار کم و در حال کاهش می باشد (جدول ۴) و طی دهه اخیر بطور میانگین $4/19$ درصد کل گوشت و $4/06$ درصد کل خاویار در صید کشورمان را به خود اختصاص داده است (جدول ۵).

به منظور بازسازی ذخایر این گونه در دریای خزر طبق آمار ارائه شده توسط شیلات ایران طی دهه اخیر بطور میانگین هرساله تعداد ۶۷۹۰۰۰ قطعه بچه تاسماهی روسی از طریق تکثیر مصنوعی تولید و در دریای خزر رها سازی شده است (جدول ۶).

جدول ۴- میزان صید، استحصال خاویار و گوشت تاسماهی روسی

در آبهای ایران طی سالهای ۱۳۷۸-۱۳۸۷ (برحسب تن)

سال	۱۳۷۸	۱۳۷۹	۱۳۸۰	۱۳۸۱	۱۳۸۲	۱۳۸۳	۱۳۸۴	۱۳۸۵	۱۳۸۶	۱۳۸۷
صید	۵۶/۷۸۳	۴۶/۶۶۴	۳۱/۴۰۷	۳۴/۲۳	۲۰/۷۳۱	۹/۷۵	۵/۸۹۹	۴/۴۵۵	۴/۴۳۷	۱/۸۴
گوشت	۴۳/۶۷۹	۳۵/۸۹۵	۲۴/۱۵۹	۲۶/۳۳	۱۵/۹۷۶	۷۱/۱۰۲	۴/۵۳۸	۳/۴۵۲	۲/۶۲۷	۱/۳۷۸
خاویار	۵/۸۰۶	۴/۳۱۵	۳/۴۷	۳/۴۴	۱/۹۶۵	۱/۰۱۶	۰/۵۵۶	۰/۴۷۵	۰/۴۴۲	۰/۲۰۳

جدول ۵- درصد میزان صید، استحصال خاویار و گوشت تاسماهی روسی

در آبهای ایران طی سالهای ۱۳۸۷-۱۳۷۸

سال	۱۳۷۸	۱۳۷۹	۱۳۸۰	۱۳۸۱	۱۳۸۲	۱۳۸۳	۱۳۸۴	۱۳۸۵	۱۳۸۶	۱۳۸۷	میانگین
صید	۶/۱	۵/۶	۳/۶	۵	۴/۱	۳/۴	۳/۵	۳/۲	۴/۶	۲/۸	۴/۱۹
گوشت	۶/۱	۵/۶	۳/۶	۵	۴/۱	۳/۴	۳/۵	۳/۲	۴/۶	۲/۸	۴/۱۹
خاویار	۶	۴/۷	۳/۹	۵/۱	۳/۹	۳/۸	۳	۳/۱	۴/۲	۲/۹	۴/۰۶

جدول ۶- آمار رهاکرد بچه ماهیان تاسماهی روسی حاصل از

تکثیر مصنوعی در آبهای ایران طی سالهای ۱۳۸۷-۱۳۷۸ (میلیون عدد)

سال	۱۳۷۸	۱۳۷۹	۱۳۸۰	۱۳۸۱	۱۳۸۲	۱۳۸۳	۱۳۸۴	۱۳۸۵	۱۳۸۶	۱۳۸۷	میانگین
تعداد	۰/۹۶۰	۱/۳۲۷	۱/۷۸۳	۱/۸۱۷	-	۰/۴۰۵	۰/۱۷۸	۰/۰۹	۰/۱۶۶	۰/۰۶۸	۰/۶۷۹

۳-۱-۱- کاربوتایپ تاسماهیان

تاکنون کاربوتایپ ۱۷ گونه تاسماهی تهیه و گزارش شده است. تاسماهیان از نظر تعداد کروموزومها به دو

گروه ۱۲۰ کروموزومی (گروه A) و ۲۴۰ کروموزومی (گروه B) تقسیم می شوند (جدول ۷)

جدول ۷- تعداد کروموزومها، تعداد بازوهای کروموزومی (NF) و کاربوتایپ تاسماهیان

گروه	نام گونه	تعداد کروموزومها و بازوهای کروموزومی، کاربوتایپ	محققین
A	<i>A. nudiventris</i> تاسماهی شپ	$2n=118\pm3$, $NF=172\pm4$; 54 ± 4 m, $4a, 60\pm3$ mc $2n=118\pm2$ $2n=116\pm4$, $NF=116\pm4 + 60\pm4$	Arefiev (1983) Sokolov and Vasiliev (1989) Nowruzfashkhami et al. (2006)
	<i>A. oxyrinchus</i> تاسماهی آتلانتیک	$2n=121\pm3$	Fontana et al.(2007) ; Blacklidge and Bidwell (1993)
	<i>A. ruthenus</i> ماهی استرلیاد	$2n=116\pm4$, $NF=177$; 66 m/sm , 40 a/mc $2n=118\pm2$, $NF=118\pm2+82\pm4$; 82 ± 4 m/sm $2n=118\pm4$, $NF=176\pm4$; 58 m/sm, $4a$, 56 ± 4 mc $2n=117\pm1$, $NF=175\pm1$, 57 ± 1 m, 60 ± 1 a $2n=118\pm9$ $2n=118\pm4$ $2n=118\pm4$	Fontana et al.(1975) Birstein and vasiliev (1987) Rab (1986) Arefiev (1989) Fontana (1994) Fontana et al.(1995) Fontana et al.(1999)
	<i>A. stellatus</i> ماهی ازون برون	$2n=118\pm2$, $NF=118\pm2+70\pm4$; 70 ± 4 m/sm $2n=118\pm2$, $NF=186\pm2$ $2n=118\pm1$, $NF=356$ $2n=114$	Birstein and vasiliev (1987) Suciu and Ene (1996) Nowruzfashkhami (1996) Nowruzfashkhami and Khosroshahi 1999)

ادامه جدول ۷:

گروه	نام گونه	تعداد کروموزومها و بازوهای کروموزومی، کاریوتایپ	محققین
A	<i>A. sturio</i> تاسماهی اروپا	$2n=116\pm4$, $70m/sm + 4a + 40mc$ $2n=121\pm3$, $NF=198$; $78m/sm + (43a, mc)$	Fontana and Colombo (1974) Tagliavini et al. (1999)
	<i>H. huso</i> فیلماهی	$2n=116\pm4$, $NF=182$; $68m/sm + 46a$ $2n=118\pm3$, $NF=180\pm4$; $62\pm4m+6a$, $50\pm3c$ $2n=118\pm2$, $NF=118\pm2 + 60\pm2$; $60\pm2m/sm$ $2n=119\pm1$, $NF=178\pm1$, $62\pm1m + 58\pm1a$ $2n=118\pm1$, $NF=178\pm1$, $6\pm1m + 58\pm1a$ $2n=116\pm1$, $NF=356$ $2n=120\pm18$ $2n=118\pm2$, $NF=202$, $84m/sm + 34a/mc$ $2n=117$	Fontana and Colombo (1974) Serebryakova et al (1983) Birstein and Vasiliev (1987) Arefiev (1989) Arefiev and Nikolaev (1991) Nowruzfashkhami (1996) Fontana et al (1997) Fontana et al (1998a) Nowruzfashkhami and Khosroshahi (1999)
	<i>Huso dauricus</i> کالوگا	$2n=120$	Burtzev et al (1976)
	<i>Scaphirhynchus platyrhynchus</i> ماهی پاره پوزه	$2n=112$, $NF=162$; $50m+14a+48mc$	Ohno et al (1969)
	<i>Polyodon spathula</i> شبه تاسماهی می سی سی پی	$2n=120$, $NF=160$; $32m + 8a + 72mc$	Dingerkus and Howell (1976)
B	<i>Acipenser baeri</i> تاسماهی سبیری	$2n=249\pm5$, $NF=308\pm4$ $2n=246\pm8$, $NF=346$, $98m/sm + 150a/mc$ $2n=246\pm10$	Vasiliev et al. (1980) Fontana (1994) Fontana et al. (1997)
	<i>A. gueldenstaedtii</i> تاسماهی روسی	$2n=250\pm8$, $NF=250\pm8+92\pm4$, $92\pm4 m/sm$ $2n=249\pm2$, $NF=346\pm2$, $98\pm1m + 152\pm3a$ $2n=256\pm8$ $2n=258\pm4$, $NF=364\pm8$, $106m/sm + 152a$	Birstein and Vasiliev (1987) Arefiev and Nikolaev (1991) Fontana et al. (1995) Fontana et al. (1996)
	<i>A. medirostris</i> تاسماهی سبز	$2n=249\pm8$, $NF=352$, $96m/sm + 6a+144mc$	Van Eennennaam et al. (1999)
	<i>A. persicus</i> تاسمای ایرانی	$2n>200$ $2n=258\pm4$, $67m/sm + 64a/mc$	Nowruzfashkhami (1996) Nowruzfashkhami et al. (2000)
	<i>A. naccarii</i> تاسماهی آدریاتیک	$2n=239\pm7$, $NF=388$; $150m/sm + 88a/mc$ $2n=246\pm8$ $2n=241\pm3$, $NF=329\pm4$, $88\pm2 m + 153a+mc$ $2n=246\pm8$ $2n=248\pm4$, $NF=424$; $174m/sm+2st + (2a+mc)$	Fontana and Colombo (1974) Fontana (1994) Arlati et al. (1995) Fontana et al. (1995) Fontana et al. (1999)

ادامه جدول ۷:

گروه	نام گونه	تعداد کروموزومها و بازوهای کروموزومی، کاریوتایپ	محققین
B	<i>A. schrenckii</i> تاسماهی آمور	$2n=240$	Vasiliev et al. (1980)
	<i>A. sinensis</i> تاسماهی چینی	$2n=264 \pm 4$, $NF=362$; $78m + 20sm + (166a+mc)$	Yu et al. (1987)
	<i>A. transmontanus</i> تاسماهی سفید	$2n=237-243$ $2n=248 \pm 8$, $NF=352$; $104m/sm + 44a/mc$ $2n=226-288$ $2n=246 \pm 10$ $2n=271 \pm 2/5$, $NF=306$, $132m/sm+44a+98mc$	Hedrick et al.(1991) Fontana (1994) Sola et al. (1994) Fontana et al.(1997) Van Eennenaaam et al. (1998a)
	<i>A. fluvescens</i> تاسماهی دریاچه ای	$2n=262 \pm 2$	Fontana et al.(2004) ; Blacklidge and Bidwell,1993
	<i>A. brevirostrum</i> تاسماهی پوزه کوتاه	$2n=372 \pm 6$	Fontana et al.(2008)
	<i>A. mikadoi</i> تاسماهی ساخالین	براساس میزان DNA موجود در هسته و مقایسه آن با سایر گونه ها که تعداد کروموزوم آنها مشخص شد پیش بینی می گردد تعداد کروموزومهای این گونه $2n=500$ عدد باشد.	

وجه مشترک کاریوتایپ تاسماهیان وجود باندهای هتروکروماتینی بر روی نواحی نزدیک سانترومر در کروموزومهای اکروسانتریک، همچنین وجود تعداد زیادی کروموزوم و میکروکروموزوم است که میکروکروموزومها تقریباً ۱/۳ تعداد کل کروموزومها را تشکیل می دهند. از دیگر مشخصات کروموزومهای ماهیان خاویاری فقدان یا نادر بودن نواحی هتروکروماتینی در کروموزومهای ساب متاسانتریک و متاسانتریک بزرگ و متوسط است. فقط در ازون برون یک ناحیه هتروکروماتینی بر روی بازوی کوتاه یک جفت کروموزوم ساب متاسانتریک بزرگ وجود دارد.

۴-۱-۱- DNA ژنومی تاسماهیان

تحقیقات انجام شده در مورد میزان DNA ژنومی تاسماهیان نشان داد مقدار DNA ماهیان گروه B تقریباً دو برابر ماهیان گروه A می باشد. به عنوان مثال بررسیهای Fontana (۱۹۷۶) نشان داد میزان DNA ژنومی تاسماهی آدریاتیک ۶/۲۶ پیکوگرم یعنی تقریباً دو برابر مقدار DNA فیلماهی (۳/۶۰ پیکوگرم) و تاسماهی اروپایی (۳/۵۸ پیکوگرم) است.

در ژنوم ماهیان خاویاری توالی های غیرکدکننده و تکراری وجود دارد که در سرتاسر مولکول DNA چندین بار تکرار شده و عمدتاً در تلومرها، سانترومرها و یا سایر نواحی هتروکروماتینی کروموزومها قرار دارند. این توالیهای تکراری DNA ماهواره ای (SatDNA) نامیده می شود. SatDNA برای بررسیهای سیتوژنتیک نظیر تشخیص کروموزومهای همولوگ و ناهنجاریهای کروموزومی می تواند مفید باشد و چنانچه بطور مشترک در چندین گونه وجود داشته باشد ابزار خوبی برای بررسی تاکسونومی و تکامل آن گونه ها تلقی می شود (Aranson و همکاران، ۱۹۹۲).

۲-۱- مروری بر منابع

۱-۲-۱- بررسیهای تاکسونومیک تاسماهی ایرانی و تاسماهی روسی در خارج کشور

اولین بار Borodin در سال ۱۸۹۷ به هنگام بررسیهای مورفومتریکی و بیولوژیک تاسماهیان رودخانه های کورا و اورال، تاسماهی ایرانی را در رودخانه اورال شناسایی و به عنوان یک گونه مستقل با نام علمی *Acipenser persicus* Borodin, 1897 معرفی نمود. بعدها Berg در سال ۱۹۴۸ با بررسیهای مقایسه ای چندین شاخص مورفومتریکی و مرستیکی دو گونه تاسماهی ایرانی و تاسماهی روسی اعلام نمود تاسماهی ایرانی زیرگونه ای از تاسماهی روسی تحت عنوان *Acipenser gueldenstaedtii persicus* Borodin, 1897 است و محل اصلی پراکنش آن رودخانه های کورا و سفیدرود می باشد (Holcik, ۱۹۸۹).

Artyukhin (۱۹۷۴) با بررسی ۴ پارامتر مرستیکی و ۸ پارامتر مورفولوژیک و تحقیقات هیستولوژیک اعلام نمود تاسماهیانی که در اواخر بهار به ولگا مهاجرت می کنند *Acipenser gueldenstaedtii persicus* و مهاجرین تابستانه به رودخانه مذکور همان تاسماهی روسی *Acipenser gueldenstaedtii* می باشند.

Artyukhin در سال ۱۹۷۹ تاسماهیانی را که در اواخر بهار به اورال مهاجرت می کند تاسماهی ایرانی معرفی نمود. طبق نظر Lukyanenko (۱۹۷۳) و Artyukhin (۱۹۷۹) در رودخانه ولگا تاسماهی ایرانی عمدتاً در اواخر بهار و اوایل تابستان ولی تاسماهی روسی در اواخر زمستان و اوایل بهار تخمیزی می کند و این موضوع نشان می دهد این دو ماهی از نظر ژنتیکی با هم فرق می کنند گرچه بعدها Mitrofanov و همکارانش (۱۹۸۶) اعلام نمودند در رودخانه اورال این دو ماهی در یک زمان و در یک مکان تخمیزی می کنند.

پژوهشهای مقایسه ای انجام شده در مورد تاسماهی روسی و تاسماهی ایرانی رودخانه ولگا نشان داد این دو گونه از نظر ۵ شاخص مریستیک و ۳۵ پارامتر مورفومتریکی و برخی از شاخصهای بیولوژیک تفاوتی را نشان می دهند (Putilina, ۱۹۸۳a).

Mitrofanov و همکارانش (۱۹۸۶) اظهار داشتند تفاوتهای ژنتیکی و اکولوژیک کافی که نشان دهد تاسماهی ایرانی یک گونه مستقلی است وجود ندارد. همچنین تفاوت موجود در زمان تخمیزی این دو ماهی یک اختلاف ژنتیکی نیست و اختلافات مریستیک و مورفومتریکی آنها نیز نشان دهنده اینست که تاسماهی ایرانی زیرگونه ای از تاسماهی روسی است.

بررسی ترکیبات آنتی ژنی پروتئینهای سرم خون تاسماهی ایرانی و تاسماهی روسی نیز تفاوت اساسی را نشان داد. تاسماهی ایرانی دارای سه ترکیب آنتی ژنی اختصاصی به نام آلبومینها، α -گلوبولین، β_1 و α_2 گلوبولین در سرم خون خود می باشد در حالیکه این آنتی ژنها در تاسماهی روسی وجود ندارد (Lukyanenko و همکاران، ۱۹۷۴ ; Sedov و Lukyanenko، ۱۹۶۷ بر گرفته از Holcik, ۱۹۸۹).

تحقیقات مقایسه ای انجام شده توسط Birstein و DeSalle (۱۹۹۸)، Birstein و همکارانش (۲۰۰۰)، Birstein و Doukakis (۲۰۰۱) در مورد ژنهای DNA میتوکندریایی (mtDNA): cytb (650bp)، 12S (150bp)، 16S (350bp)، ND5 (645bp) و D-loop (846 bp)، همچنین تحقیقات Mague و همکارانش (۲۰۰۸) در مورد نواحی کنترل کننده mtDNA (D-loop) تاسماهی ایرانی و تاسماهی روسی اختلافی را بین این دو گونه نشان نداد لذا این محققین عنوان داشتند تاسماهی ایرانی را نمی توان گونه ای مستقل از تاسماهی روسی در نظر گرفت.

Rubana و همکارانش (۲۰۰۸) cytochrome b (cyt b)، همچنین ۲۸ شاخص مورفومتریکی و ۶ شاخص مریستیک تاسماهیان ایرانی جمع آوری شده از سواحل جنوبی دریای خزر را مورد بررسی قرار دادند. آنها براساس نتایج کسب شده استقلال گونه ای تاسماهی ایرانی از تاسماهی روسی را منتفی دانستند.

علیرغم اختلاف نظرهای موجود بین محققین مختلف در مورد استقلال گونه ای تاسماهی ایرانی، در حال حاضر این گونه توسط CITES به عنوان یک گونه مستقل در نظر گرفته شده است.

علاوه بر روشهای ژنتیک مولکولی، عده ای از محققین از جمله Fontana (۲۰۰۲) با استفاده از تکنیک FISH و با بررسی SatDNA خویشاوندی موجود بر روی کروموزومهای تاسماهی روسی و مقایسه آن با برخی از تاسماهیان

از جمله فیلماهی، تاسماهی اروپایی، ازون برون، ماهی شیپ، تاسماهی سفید توانستند جایگاه تاکسونومیک و رابطه فیلوژنیک این گونه را با گونه های مذکور مشخص کنند.

۲-۱-۲- بررسیهای تاکسونومیک تاسماهی ایرانی و تاسماهی روسی در داخل کشور

بررسی مقایسه ای انجام شده در مورد ۲۶ شاخص مورفومتریک بین تاسماهی روسی و تاسماهی ایرانی سواحل جنوبی دریای خزر توسط نصری چاری (۱۳۷۲) حاکی از عدم وجود اختلاف معنی دار در ۴ شاخص (تعداد شعاع باله مخرجی، تعداد برجستگیهای استخوانی شکمی، ارتفاع سر در انتها، نسبت ارتفاع سر در مرکز چشم به طول کلی) و وجود تفاوت معنی دار در مورد ۲۴ شاخص (سن، طول کل، طول فورک، طول سر، طول پوزه، تعداد شعاع باله پشتی، تعداد برجستگیهای استخوانی پشتی، تعداد برجستگیهای استخوانی پهلویی، تعداد خارهای آبششی، وزن شکم پر، عرض پوزه در محل سیلک، عرض پوزه، ارتفاع سر در مرکز چشم، فاصله نوک پوزه تا سیلک، فاصله سیلک تا دهان، نسبت عرض پوزه در محل سیلک به طول کلی، فاصله نوک پوزه تا سیلک به طول سر، فاصله نوک پوزه تا دهان به طول سر، نسبت طول سر به طول کلی، نسبت طول پوزه به طول کلی، نسبت ارتفاع سر در انتها به طول کلی، نسبت عرض پوزه به طول کلی) می باشد. در مطالعه بیوشیمیایی انجام شده توسط کیوان (۱۳۸۲)، در نتیجه ایزوالکتروفوکوسینگ مولکولهای پروتئین خاویار تاسماهی ایرانی و تاسماهی روسی بر روی ژل پلی آکریل آمید، دو باند پروتئینی مربوط به تاسماهی روسی و یک باند پروتئینی مربوط به تاسماهی ایرانی در محدوده pH بین ۵/۷ تا ۶ وجود داشت.

در تحقیق انجام شده بین تاسماهی ایرانی و تاسماهی روسی توسط Rezvani (۱۹۹۷) با استفاده از پرایمرهای تصادفی RAPD تفکیک گونه ای تاسماهی ایرانی از تاسماهی روسی امکانپذیر نشد.

در مطالعه فیلوژنی انجام شده بین تاسماهی ایرانی و تاسماهی روسی با استفاده از توالی بخشی از ژن ND5/6 مشخص گردید این دو گونه حداقل یک میلیون سال پیش از همدیگر منفک شدند (Pourkazemi et al., 2000).

قرایی (۱۳۸۰) ۵۵ آغازگر (پرایمر) تصادفی RAPD مورد استفاده قرار گرفت که ۳۶ آغازگر در هر دو گونه تولید باندهای DNA متفاوتی نمودند. تجزیه و تحلیل آماری داده ها نشان داد بطور میانگین تفاوت بین این دو

گونه بیش از ۷۰٪ است. نتایج بدست آمده در این تحقیق مبین جدایی تاسماهی ایرانی از تاسماهی روسی بود ولی از آنجایی که این مارکر دارای تکرارپذیری پایینی است لذا تکرار، نتایج آزمایشات اولیه را در برنداشت.

۳-۱ - تکنیک (FISH) Fluorescent In Situ Hybridization

بکارگیری تکنیک FISH از دهه ۱۹۹۰ برای مطالعات کروموزومی باعث کسب تجربیات عالی شد و امکان تلفیق دانستیهای ژنتیک مولکولی و سیتوژنتیک میکروسکوپی و بوجود آمدن سیتوژنتیک مولکولی را فراهم نمود. در حال حاضر سیتوژنتیک میکروسکوپی و سیتوژنتیک مولکولی مکمل هم می باشند و استفاده از یکی بدون دیگری منجر به کسب اطلاعات غلط و ناکافی از ساختمان و عملکرد کروموزومها خواهد شد.

استفاده از تکنیک FISH باعث پیشرفتهای مهمی در زمینه ژنتیک و سیتوژنتیک ماهیان در سطح مولکولی شده است. از کاربردهای این تکنیک در مطالعات کروموزومی ماهیان می توان شناسایی و مکان یابی توالیهای خاص بر روی کروموزومهای متافازی و هسته های اینترفازی از جمله پی بردن به وجود ژنهای ریبوزومی (rDNAs)، ژنهای چند نسخه ای مربوط به هیستونها، شناسایی DNA ماهواره ای در چندین گونه از ماهیان که اطلاعات جدیدی را در باره تکامل آنها فراهم نمودند اشاره کرد. شناسایی توالیهای خاص سانترومری و تلومری در نتیجه تشخیص دقیق تعداد و نوع کروموزومها، شناسایی کروموزومهای خاص نظیر کروموزومهای جنسی و میکروکروموزومها، کروموزومهای همولوگ، تشخیص همسانی بازوهای کروموزومی گونه های خویشاوند، تشخیص انواع پلی پلویدی از جمله تریپلویدی و تتراپلویدی، انواع پلی زومی و مونوزومی، بررسی نو ترکیبی های کروموزومی، تشخیص نواحی هتروکروماتینی، شناسایی دو رگه های طبیعی و مصنوعی، تشخیص گونه های مختلف ماهیان با استفاده از توالیهای خاص گونه ای از دیگر کاربردهای تکنیک FISH می باشد (Philip, 1996). تاکنون توالیهای تکراری از سانترومرها، تلومرها و کروموزومهای جنسی گونه های مختلف ماهیان شناسایی و جدا شده اند که برخی از این توالیها به عنوان پروبهای جنسی، کروموزومی و گونه ای استفاده می شوند.

۱-۳-۱- کاربردهای تکنیک FISH در ماهیان

از کاربردهای تکنیک FISH در ماهیان می توان به موارد ذیل اشاره نمود:

۱-۳-۱-۱- تعیین توالیهای خاص سانترومری و تلومری

توالیهای سانترومریک در ماهی *Chiomdraco hamatus* (Capriglione et al., ۱۹۹۴)، *Hoplias malabaricus* (Haaf et al., ۱۹۹۳)، *Sparus aurata* (Garrido-Ramos et al., ۱۹۹۴) و قزل آلالی قطبی *Salvelinus alpinus* (Hartley & Davidson, ۱۹۹۴) جدا شد و مورد بررسی قرار گرفت. توالی جدا شده از *C. hamatus* که در اثر هضم DNA ژنومی بوسیله آنزیم *Bgl* II بدست آمد منومری با ۱۰۰۰bp بود که در اغلب تلومرها و سانترومرها وجود داشت. توالی جدا شده از *S. auratus* که در اثر هضم DNA ژنومی با آنزیم *Eco* RI بدست آمد منومری با ۱۸۶bp (۶۷٪) بود و در ناحیه سانترومری این گونه و ۶ گونه دیگر این جنس پیدا شد. توالی جدا شده از *H. malabaricus* از طریق هضم DNA ژنومی بوسیله *Hind* III منومری با ۳۵۵bp بود. این توالی دارای دو نوع A و B (با ۳۶٪ تشابه توالی) بود. نوع A در سانترومر بیش از نیمی از کروموزومها تشخیص داده شد. نوع B عمدتاً روی یکی از کروموزومهای جفت کروموزوم جنسی وجود داشت.

توالی جدا شده از *S. alpinus* که در اثر هضم cDNA ژنومی بوسیله آنزیم *ALU* I بدست آمد منومری تکراری با ۱۲۷bp بود. این توالی در سانترومر چند کروموزوم اکروسانتریک وجود داشت و در تمامی گونه های جنس *salvelinus* شناسایی شد. یک توالی مشابه آن که از طریق هضم DNA ژنومی بوسیله آنزیم *SnAluI*-5 از قزل آلالی دریاچه ای جدا شد در سانترومرهای کروموزومهای متاسانتریک قزل آلالی قطبی نیز وجود داشت.

با استفاده از پروبهای تلومری وقوع نوترکیبی های کروموزومی بین گونه ای در چندین گروه از ماهیان از جمله آزاد ماهیان (Phillips & Ihssen, ۱۹۹۰)، Blennids (Arefiev, ۱۹۹۱)، goboids (Turner et al., ۱۹۸۵) و شگ ماهی (Klinkhardt, ۱۹۹۳) و سوف ماهیان (Amores et al., ۱۹۹۰) شناسایی گردید.

با استفاده از پروبهای تلومری وقوع نوترکیبی های کروموزومی بین گونه ای در چندین گروه از ماهیان از جمله gobeids (Turner et al., ۱۹۸۵)، آزاد ماهیان (Phillips & Ihssen, ۱۹۹۰)، سوف ماهیان (Amores et al., ۱۹۹۰)، Blennids (Arefiev, ۱۹۹۱) و شگ ماهی (Klinkhardt, ۱۹۹۳) شناسایی گردید. تکثیر DNA حاصل از فلسهای خشک و نمونه بافتهای بدست آمده از ماهیان مختلف حتی گونه های قدیمی و منقرض شده از طریق واکنش PCR، استفاده از تکنیک FISH و پروبهای تلومری و سانترومری تعیین تعداد کروموزومها، اندازه کروموزومها و نوع کروموزومهای آنها را مقدور می سازد.

۲-۱-۳-۱- شناسایی توالیهای وابسته به جنس یا کروموزوم جنسی

توالیهای وابسته به جنس یا کروموزوم جنسی از چندین ماهی از جمله guppy (Nanda et al., ۱۹۹۰)، *Chiondraco hamatus* (Capriglione et al., ۱۹۹۴)، *Oncorhynchus tshawytscha* (Devlin et al., ۱۹۹۱ ; Devlin et al., ۱۹۹۴) جدا شد. دو توالی وابسته به جنس از *L. elongatus* نیز استخراج شد (ZW/ZZ ; Nakayama et al., ۱۹۹۴) که یک توالی بر روی هر دو کروموزوم Z، W و دیگری فقط در کروموزوم W وجود داشت. بعدها این توالیها به عنوان پروب برای تشخیص افراد نر و ماده این گونه استفاده شد. پروبهای اختصاصی مربوط به کروموزوم X و Y امکان تعیین جنسیت ماهیان و یا سلولهای بدست آمده (مثلاً اسپرم) از ماهیانی را که سیستم تعیین جنسیت آنها مانند ماهی قزل آلا ی رنگین کمان XX/XY می باشد امکانپذیر نموده است.

۳-۱-۳-۱- تعیین جایگاه DNA ریبوزومی (rDNA)

با استفاده از تکنیک FISH جایگاه توالیهای rDNA در مورد ماهی آزاد اطلس و چند گونه از ماهی قزل آلا (*Oncorhynchus*) شناسایی شد (Pendas et al., ۱۹۹۳a).

۴-۱-۳-۱- پروب های کروموزومی خاص گونه ای

با استفاده از پروبهای کروموزومی خاص گونه ای، تشخیص سریع دو رگه های تولید شده بطور مصنوعی و دو رگه های طبیعی، همچنین منشا کروموزومها در سلولهای دو رگه حاصل از تلاقی بین دو گونه مختلف را می توان شناسایی نمود. پروبهای خاص گونه ای برای تعیین سرنوشت کروموزومها در دو رگه های دیپلوئید و تریپلوئید بین گونه ای بسیار سودمند خواهند بود. با پروبهای خاص گونه ای تعیین نمودن اینکه کدام کروموزومها در سلولهای آنوپلوئید حذف شده اند نیز امکان پذیر است.

۵-۱-۳-۱- بررسی DNA ماهواره ای (SatDNA) در تاسماهیان

در تاسماهیان یک DNA ماهواره ای با استفاده از آنزیم *HindIII* از ژنوم تاسماهی آدریاتیک *Acipenser naccarii* جدا شد و توسط De La Herran و همکارانش (۲۰۰۱) و Robles و همکارانش (۲۰۰۴) به عنوان یک پروب FISH برای مطالعه فیلوژنیک تعدادی از تاسماهیان استفاده شد. بعدها جایگاه SatDNA مذکور توسط Lanfredi و همکارانش (۲۰۰۱) در کروموزومهای ماهی استرلیاد، فیلماهی، تاسماهی روسی، تاسماهی سفید، تاسماهی سیبری و تاسماهی آدریاتیک بررسی شد.

۲-۱-۳-۱- مراحل مختلف آزمایشهای FISH

۱-۳-۲-۱- تهیه گسترشهای کروموزومی

لازمه انجام موفقیت آمیز روش FISH تا حد زیادی به کیفیت گسترشهای کروموزومی و یا بافتی تهیه شده بستگی دارد و بهترین نتایج از لامهای دارای کیفیت مطلوب بدست می آید. به منظور تهیه گسترشهای کروموزومی با کیفیت خوب می توان از روش له کردن بافت و یا کشت بافت استفاده نمود.

۲-۲-۳-۱- پیش تیمار گسترشهای کروموزومی تهیه شده

برای انجام دو رگه گیری مناسب بین پروب^۳ و DNA هدف و اجتناب از دو رگه گیری ناخواسته پروب با مواد پروتئینی و مولکول RNA که ممکن است بطور اتفاقی در روی لام وجود داشته باشد پیش تیمار لامهای حاوی گسترش کروموزومی با پروتئیناز و RNase بسیار مهم می باشد.

در تکنیک FISH، شناسایی و تعیین مکان توالیهای خاص بر روی مولکول DNA هدف که ممکنست کروموزومهای متافازی یا هسته های اینترفازی باشد مستلزم استفاده از یک سیستم تلفیقی نشانگذاری پروبها، اتصال آن به DNA هدف (ممکنست کروموزومهای تثبیت شده بر روی لام باشد) و آشکارسازی پروب می باشد. لذا بدین منظور پروب مورد نظر باید ابتدا با مواد فلئورسنت^۴ ترکیب شود، سپس طی مراحل پروب ترکیب شده با مواد فلئورسنت بر روی لام میکروسکوپی با DNA هدف پیوند داده شود. سپس DNA هدف حاوی پروب نشانگذاری شده با میکروسکوپ فلئورسنت مورد بررسی قرار می گیرد. با توجه به مواد فلئورسنت استفاده شده پروبهای مورد نظر زیر میکروسکوپیهای مذکور بصورت نقاط رنگی مشاهده می شوند.

^۳ پروب به یک قطعه کوتاه از DNA یا RNA (اولیگونوکلوئتیدها) با توالیهای مشخص گفته می شود. DNA کلون شده، DNA ژنومی، محصول PCR و اولیگونوکلوئتیدهای سنتتیک می توانند به عنوان پروب استفاده شوند

^۴ مواد شیمیایی که در اثر تاباندن نور با طول موج کوتاه تحریک می شوند و نوری با طول موج بلند از خود گسیل می کنند.

۲- دلایل و اهداف طرح

علیرغم معرفی تاسماهی ایرانی به عنوان یک گونه مستقل تحت عنوان (*Acipenser persicus*) که نتیجه مطالعات تاکسونومیک انجام شده بین این دو گونه توسط محققین خارج و داخل کشور می باشد هنوز برخی از محققین و متخصصین ژنتیک مخالف استقلال گونه ای تاسماهی ایرانی هستند. آنها معتقدند با توجه به اینکه تاکنون هیچ شواهد ژنتیکی مبنی بر استقلال گونه ای تاسماهی ایرانی از تاسماهی روسی بدست نیامده لذا این ماهی را باید زیرگونه ای از تاسماهی روسی بحساب آورد.

بدون شک این موضوع به نوبه خود در آینده باعث اثرات منفی در تصمیم گیریهای CITES در تعیین سهمیه صادرات خاویار تاسماهی ایرانی برای کشورمان خواهد شد. زیرا مقامات شیلات روسیه معتقدند تاسماهی ایرانی زیرگونه تاسماهی روسی یا به عبارتی همان تاسماهی روسی است و چون از لحاظ مولکولی، مورفولوژیکی و بیوشیمیایی نمی توان خاویار تاسماهی ایرانی را از خاویار تاسماهی روسی شناسایی و تفکیک نمود لذا مجوز صادرات برای سهمیه خاویار تاسماهی ایرانی و روسی به درستی نمی تواند صورت پذیرد زیرا هر یک از کشورهای حاشیه خزر می توانند خاویار تاسماهی روسی را به نام خاویار تاسماهی ایرانی صادر نمایند.

اثبات جدایی دو گونه تاسماهی ایرانی و تاسماهی روسی با استفاده از تکنیکهای مختلف ژنتیکی و معرفی تاسماهی ایرانی به عنوان یک گونه مستقل ضمن کشف حقایق علمی مبنی بر متمایز بودن این دو گونه، بدون شک نقش بسزایی در نظام بهره برداری و صادرات خاویار ایران خواهد داشت. در صورت دستیابی به این مهم، قادر به دفاع از حقوق ملی خود در حفظ حداکثر سهمیه صادرات خاویار تاسماهی ایرانی برای کشورمان و حقانیت کشورمان در اجرای موفقیت آمیز طرحهای حفاظت و بازسازی ذخایر با ارزش تاسماهیان بخصوص تاسماهی ایرانی خواهیم بود. همچنین علیرغم اینکه بررسی SatDNA خویشاوندی تاسماهیان (تقریباً ۱۷۰bp) در کروموزومهای تاسماهیان با استفاده از تکنیک FISH ابزار خوبی را برای بررسی فیلوژنیک تاسماهیان فراهم نمود اما تاکنون در مورد وجود این SatDNA خویشاوندی و محل قرار گرفتن آن بر روی کروموزومهای تاسماهی ایرانی هیچ مطالعه ای در داخل و خارج کشور انجام نشده است. به علاوه تاکنون تکنیک FISH در کشورمان در زمینه های مختلف تحقیقات آبریان از جمله تاسماهیان بکار گرفته نشده است. لذا این طرح به منظور دستیابی به اهداف ذیل انجام پذیرفت :

- ۱- شناسایی و جداسازی SatDNA خویشاوندی تاسماهیان از ژنوم تاسماهی ایرانی و تعیین توالی آن
- ۲- شناسایی و جداسازی SatDNA خویشاوندی تاسماهیان از ژنوم تاسماهی روسی و تعیین توالی آن
- ۳- بهینه و استاندارد کردن تکنیک FISH در ماهیان مورد آزمایش و تعمیم آن برای سایر ماهیان در آینده
- ۴- تعیین تعداد و نوع کروموزومهایی که SatDNA خویشاوندی بر روی آنها وجود دارد

۳- روش کار

به منظور انجام آزمایشات، ۲۰ عدد تاسماهی ایرانی ۲-۳ ساله با میانگین طولی $13/85 \pm 59/06$ سانتیمتر و میانگین وزنی $481/87 \pm 736/66$ گرم (جدول ۸) و ۲۰ عدد تاسماهی روسی ۲-۳ ساله با میانگین طولی $47/60 \pm 9/02$ سانتیمتر و میانگین وزنی $414/46 \pm 578/94$ گرم (جدول ۹) را بطور تصادفی جدا نموده و بطور جداگانه در دو عدد وان ۵۰۰ لیتری موجود در بخش تکثیر و پرورش انستیتو تحقیقات بین المللی ماهیان خاویاری دکتر دادمان نگهداری شدند.

جدول ۸- مشخصات طولی و وزنی تاسماهیان ایرانی مورد آزمایش

نمونه	طول کل (cm)	وزن (g)	نمونه	طول کل (cm)	وزن (g)
۱	۴۶	۳۰۶/۳	۱۱	۵۵/۲	۶۷۲/۸
۲	۴۱/۲	۲۴۸/۴	۱۲	۷۰/۵	۸۸۳
۳	۴۰/۴	۲۴۳/۲	۱۳	۶۲/۳	۵۱۶/۵
۴	۶۸	۱۶۳/۱	۱۴	۶۶/۹	۶۰۶
۵	۴۱	۲۱۹/۸	۱۵	۷۴	۹۶۵
۶	۴۸	۳۸۳	۱۶	۷۷/۵	۱۴۱۲
۷	۵۱/۲	۳۵۹/۳	۱۷	۷۹	۱۴۹۸
۸	۴۵/۸	۳۰۸/۳۰	۱۸	۶۸	۱۰۷۰
۹	۵۴/۳	۴۴۸/۵	۱۹	۷۹/۳	۱۵۳۹
۱۰	۴۰	۲۴۲	۲۰	۷۲/۵	۱۱۸۱

جدول ۹- مشخصات طولی و وزنی تاسماهیان روسی مورد آزمایش

نمونه	طول کل (cm)	وزن (g)	نمونه	طول کل (cm)	وزن (g)
۱	۴۱	۲۵۲/۸	۱۱	۴۲/۷	۲۵۳/۲
۲	۴۳/۱	۲۹۰/۸	۱۲	۵۵/۵	۸۲۰
۳	۳۹/۸	۲۹۳/۷	۱۳	۶۵/۳	۱۶۰۰
۴	۴۵/۴	۳۳۸/۷	۱۴	۵۳/۶	۸۸۰
۵	۳۹/۱	۲۶۱/۳	۱۵	۴۶/۷	۴۰۰
۶	۳۶/۷	۲۰۱/۸	۱۶	۵۴/۳	۸۴۵
۷	۳۷/۲	۲۵۹/۳	۱۷	۴۹/۴	۶۲۰
۸	۳۷/۸	۲۳۸/۹	۱۸	۶۴/۸	۱۱۲۷
۹	۳۸/۶	۲۷۱/۳	۱۹	۶۳	۱۴۵۰
۱۰	۴۸	۳۷۵	۲۰	۵۰	۸۰۰

اساس تکنیک FISH استفاده از پروبهای نشاندار شده و اتصال آن به DNA هدف می باشد. با توجه به اینکه در این طرح پروب مورد نظر یک *HindIII* SatDNA باتوالی تقریباً ۱۷۰ جفت باز (bp) و DNA هدف نیز همان کروموزومهای تاسماهی ایرانی و تاسماهی روسی بود لذا ابتدا گسترشهای کروموزومی ماهیان مورد آزمایش و پروب مورد نظر تهیه شد، سپس هیبریداسیون (اتصال) بین پروب و کروموزومهای ماهیان مورد آزمایش (آزمایشات FISH) انجام گرفت.

۱-۳- تهیه گسترشهای کروموزومی ماهیان مورد آزمایش از طریق کشت گلبولهای سفید خون

برای تهیه گسترشهای کروموزومی مناسب ماهیان مورد آزمایش از روش کشت گلبولهای سفید خون استفاده شد که مراحل کار به شرح ذیل بود:

۱- ابتدا ۵ میلی لیتر محیط کشت با ترکیب ۴ میلی لیتر محیط کشت پایه RPMI- 1640 + ۱ میلی لیتر سرم جنین گاو (FBS) + فیتوهاگلوتنین PHA (یکی از انواع P یا M یا L) + ۵۰۰ واحد پنی سیلین پتاسیم + G + ۵۰۰ میکروگرم استرپتومایسین سولفات تهیه و ضد عفونی گردید.

۲- ماهیان مورد آزمایش با پودر برچه گل میخک (۲۰۰ ppm) بیهوش شدند.

۳- بوسیله یک سرنگ ۲ میلی لیتری حاوی ۰/۱ میلی لیتر ماده ضد انعقاد هپارین سدیم (۵۰۰۰ Iu/ml) از رگ ساقه دمی ماهیان مورد آزمایش به مقدار ۲-۱ میلی لیتر خونگیری شد.

۴- مقدار ۱۰-۵ قطره پلاسمای حاوی گلبولهای سفید خون و یا ۴-۲ قطره خون کامل ماهیان مورد آزمایش به ۵ میلی لیتر محیط کشت تهیه و استریل شده اضافه گردید.

۵- نمونه های کشت داده شده در دمای ۲۲-۲۰ درجه سانتیگراد (داخل دستگاه انکوباتور) نگهداری شدند.

۶- بعد از گذشت ۵ روز (۱۲۰-۱۱۰ ساعت) به نمونه های کشت داده شده کلشی سین (۰/۵ µg/ml) اضافه شد.

۷- بعد از گذشت ۵-۴ ساعت محیط کشت حاوی سلولهای خون سانتریفوژ شدند.

۸- بعد از ته نشین شدن سلولهای خون، محلول رویی را دور ریخته و به رسوب باقیمانده ۴ میلی لیتر محلول هیپوتونیک (کلرید پتاسیم ۰/۰۷۵ مولار) اضافه شد.

۹- بعد از گذشت ۳۰ دقیقه نمونه ها را سانتریفوژ نموده و پس از دور ریختن محلول رویی به رسوب باقیمانده ۴ میلی لیتر محلول فیکساتیو کارنوی (سه قسمت متانول خالص + یک قسمت اسید استیک خالص) تازه و سرد شده اضافه شد.

۱۰- پس از گذشت ۳۰ دقیقه نمونه ها را سانتریفوژ نموده و بعد از دور ریختن محلول رویی دوباره به نمونه ها ۴ میلی لیتر محلول فیکساتیو اضافه شد.

۱۱- پس از گذشت ۱۵ دقیقه نمونه ها را سانتریفوژ نموده و بعد از دور ریختن محلول رویی به رسوب باقیمانده ۱ میلی لیتر محلول فیکساتیو اضافه شد.

۱۲- رسوب باقیمانده در ۱ میلی لیتر محلول فیکساتیو به هم زده شد تا ۱ میلی لیتر سوسپانسیون سلولی بدست آید.

۱۳- سوسپانسیون سلولی بدست آمده بر روی تعدادی لام تمیز چکانده شد (۲-۳ قطره بر روی هر لام).

۱۴- لامهای تهیه شده پس از خشک شدن در دمای آزمایشگاه، با محلول گیمسای ۱۰٪ رنگ آمیزی شدند.

۱۵- بعد از گذشت ۳۰ دقیقه لامهای رنگ آمیزی شده را با آب مقطر شستشو داده و در دمای آزمایشگاه خشک گردیدند.

- سانتریفوژ نمودن نمونه ها در تمامی مراحل آزمایش در شرایط ۱۳۰۰RPMI به مدت ۸ دقیقه انجام شد.

در این تحقیق طی ۳۰ آزمایش، از تعداد ۶۱ عدد تاسماهی ایرانی و ۱۲ عدد تاسماهی روسی خونگیری شد و تعداد ۸۲ نمونه خون تاسماهی ایرانی و تعداد ۱۲ نمونه خون تاسماهی روسی به منظور بدست آوردن گسترشهای کروموزومی مناسب برای آزمایشات FISH کشت داده شد.

در آزمایشات مربوط به کشت خون ماهیان مورد آزمایش با توجه به اینکه احتمال آلودگی باکتریایی و قارچی در نمونه های کشت داده شده وجود داشت لذا همواره ۲ نمونه خون از یک نمونه ماهی کشت داده شد. به منظور بررسی نقش مقدار پلاسما کشت داده شده در کسب نتیجه آزمایش در تعدادی از آزمایشات در صورت ته نشین شدن مقدار کافی پلاسما حاوی گلبولهای سفید خون مقدار پلاسما کشت داده شده از یک نمونه ماهی یکسان بود و در تعدادی دیگر از آزمایشات مقادیر مختلفی از پلاسما یک نمونه ماهی کشت داده شد. همچنین در محیط کشت های استفاده شد از انواع فیتوهاگلوتینین (P ، M ، L) تولیدی شرکت Sigma و فیتوهاگلوتینین نوع M تولیدی شرکت Gibco با دزهای مختلف استفاده شد.

۲-۳- آزمایشات انجام شده در ارتباط با تهیه پروب (SatDNA خوشاوندی تاسماهیان)

با توجه به اینکه هدف از انجام این طرح بررسی وجود یا عدم وجود *HindIII* SatDNA و تعیین محل استقرار آن در کروموزومهای تاسماهی ایرانی و تاسماهی روسی بود لذا ابتدا می بایست پروب مورد نظر تهیه و پس از تعیین توالی آن، جایگاه این پروب بر روی کروموزومهای تاسماهی ایرانی و روسی شناسایی شود. بنابراین تصمیم گرفته شد پروب مذکور از ژنوم تاسماهی روسی و تاسماهی ایرانی استخراج شود که مراحل مختلف آزمایشات انجام شده بطور خلاصه بشرح ذیل بود:

۱- ابتدا DNA ژنومی از باله دمی و یا بافت ماهیچه ماهیان مورد آزمایش استخراج شد. در این طرح برای استخراج DNA ژنومی از روش فنل - کلروفرم (Hillis & Moritz, ۱۹۹۰) که توسط Pourkazemi (۱۹۹۶) در مورد ماهیان خاویاری تعدیل گردید استفاده شد.

۲- کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از روش الکتروفورز ژل آگارز بررسی شد.

۳- با توجه به توالی SatDNA استخراج شده از سایر تاسماهیان از جمله تاسماهی روسی پرایمر مورد نظر طراحی و سفارش ساخت آن به شرکتهای سازنده پرایمر (ندای فن راه، سیناژن، فرآیند دانش آرین) داده شد.

۴- پس از خرید پرایمرهای مورد نظر، DNA استخراج شده از تاسماهیان مورد آزمایش با استفاده از پرایمرها و روش PCR تکثیر شد. در برخی از آزمایشات انجام شده در این تحقیق شرایط PCR از جمله دمای الحاق (Annealing) پرایمر به DNA استخراج شده به منظوردستیابی به SatDNA مورد نظر تغییر داده شد.

۵- محصول PCR به منظور بررسی نتیجه با استفاده از روش الکتروفورز ژل آگارز ۲٪ الکتروفورز شد و ژل بدست آمده پس از رنگ آمیزی با نیترات نقره بررسی شد.

۶- پس از بدست آوردن پروب مورد نظر، به منظور تثبیت توالی آن، کلونینگ انجام شد.

۷- به منظور بررسی نتیجه کلونینگ پلاسمید بدست آمده الکتروفورز شد.

در این تحقیق طی ۱۱ آزمایش، DNA ژنومی ۴۷ عدد تاسماهی ایرانی و ۳۹ عدد تاسماهی روسی استخراج شد و تکثیر DNA استخراجی با استفاده از پرایمرهای طراحی شده و روش PCR انجام شد که در ذیل به دو آزمایش مربوط به تاسماهی ایرانی و تاسماهی روسی که منجر به کسب نتیجه مثبت شد اشاره می گردد:

۱-۲-۳- استخراج *HindIII* SatDNA از ژنوم تاسماهی روسی

۱- پرایمرهای موردنیاز با توجه به توالی *HindIII* SatDNA استخراج شده از تاسماهی روسی که در NCBI با شماره AJ286592 به ثبت رسیده با توالی 5'-CTT ACA GAT (F) و 3'-CTT TTT CAA ACT TTC GGG GC- (R) (TCG TTC CTG TC-3') طراحی و سفارش ساخت آن به یکی از شرکت‌های سازنده پرایمر داده شد.

۲- پس از خرید و تحویل گرفتن پرایمرهای سفارش داده شده، DNA ژنومی از ۵ عدد تاسماهی روسی به روش فنل - کلروفرم استخراج شد.

۳- DNA ژنومی استخراج شده با پرایمرهای مذکور و با استفاده از روش PCR تکثیر شدند. مخلوط واکنش PCR شامل یک واحد آنزیم *Taq* DNA polymerase، ۰/۱ میلی مولار dNTPs، ۲۰ پیکومول از هر پرایمر، بافر PCR (۱×)، ۱/۵ میلی مولار، ۰/۱ میکروگرم DNA ژنومی و آب مقطر بود.

۴- واکنش PCR شامل یک مرحله واسرشته سازی (دناتوراسیون) اولیه DNA در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه متعاقب آن ۳۰ مرحله شامل مرحله واسرشته سازی DNA در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله الحاق پرایمرها در دمای ۵۲ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله بسط (Extention) پرایمرها در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۴۵ ثانیه و یک مرحله به عنوان بسط انتهایی در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام گردید.

۵- محصول PCR با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز الکتروفورز شد و ژل بدست آمده پس از رنگ آمیزی با نیترات نقره بررسی شد.

۱-۲-۳- استخراج *HindIII* SatDNA از ژنوم تاسماهی ایرانی

۱- پرایمرهای موردنیاز با توجه به توالی *HindIII* SatDNA استخراج شده از تاسماهی روسی که در NCBI با شماره (AJ286597) به ثبت رسیده بود با استفاده از برنامه Oligo5 با ترکیب:

5'-AAA GCT CGG GCA TTG AAA T-3' (F) و 5'-GGT TCG TTC CTG TC-3' (R) طراحی و سفارش ساخت آن به شرکت‌های سازنده پرایمر داده شد.

۲- پس از خرید و تحویل گرفتن پرایمرهای سفارش داده شده، DNA ژنومی از ۵ عدد تاسماهی ایرانی به روش فنل - کلروفرم استخراج شد.

۳- کیفیت DNA های استخراج شده با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز و کمیت آن نیز با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر بررسی شد.

۴- DNA ژنومی استخراج شده با پرایمرهای مذکور و با استفاده از روش PCR تکثیر شد. حجم مخلوط واکنش PCR شامل ۰/۲ میکرولیتر آنزیم ($Taq\ DNA\ polymerase$ (5U/ μl)، ۰/۵ میکرولیتر dNTPs (۱۰mM)، ۱ میکرولیتر (۲۰ پیکومول) از هر آغازگر، ۵ میکرولیتر بافر PCR ($10\times$)، ۳ میکرولیتر $MgCl_2$ (۵۰mM)، ۱ میکرولیتر (۱۰۰ نانوگرم) DNA ژنومی و آب مقطر با حجم نهایی ۵۰ μl بود.

۵- واکنش PCR شامل یک مرحله واسرشته سازی (دناتوراسیون) اولیه DNA در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه متعاقب آن ۳۵ مرحله شامل مرحله واسرشته سازی DNA در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله الحاق پرایمرها در دمای ۵۰ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله بسط پرایمرها در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه بود و یک مرحله به عنوان بسط انتهایی در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام گردید.

۶- محصول PCR با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز الکتروفورز شد و ژل بدست آمده پس از رنگ آمیزی با نیترات نقره بررسی شد.

آزمایش ۳-۳: کلونینگ قطعه SatDNA (۱۷۰bp) تهیه شده

همانطوریکه قبلاً نیز ذکر شد به منظور تثبیت توالی بدست آمده انجام کلونینگ قطعه بدست آمده ضروری بود لذا این کار نیز در قالب این طرح انجام شد. بدین منظور ابتدا SatDNA از ژل خارج و خالص سازی شد. سپس اقدام به کلونینگ قطعه مذکور شد.

آزمایش ۱-۳-۳: جداسازی SatDNA از ژل آگارز

قطعه SatDNA (۱۷۰bp) موجود در ژل آگارز را با یک اسکاپل از روی آن جدا نموده و با استفاده از کیت‌های مخصوص (QIA GEN, Cat No. 28704) و طبق دستور آن کیت خالص سازی شد. برای این کار قطعه ژل را پس از وزن کردن در یک میکروتیوب اپندورف ۱/۵ میلی لیتری ریخته و ۳ برابر وزن ژل به آن بافر موجود در کیت اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۵۰ درجه سانتیگراد قرار داده شد. برای سهولت حل شدن ژل طی این مدت میکروتیوب ۳ بار ورتکس شد. بعد از اینکه ژل کاملاً حل شد، هم وزن ژل به آن ایزوپروپانول افزوده و پس از هم زدن بر روی ستون Qiaquick (مخصوص جدا کردن DNA از ژل) ریخته و به مدت ۱ دقیقه در ۱۳۰۰RPM سانتریفوژ گردید. پس از جدا کردن مایع زیرین، ۰/۵ میلی لیتر بافر QG به ستون افزوده و به مدت ۱ دقیقه سانتریفوژ گردید. سپس مقدار ۰/۷۵ میلی لیتر بافر PE به منظور شستشو به ستون Qiaquick افزوده و به مدت ۱ دقیقه در دور ۱۳۰۰RPM سانتریفوژ گردید. سپس مایع زیرین را جدا کرده و ستون دوباره روی همان تیوب قرار داده شد. برای جمع آوری DNA، ۵۰ میکرولیتر بافر EB یا آب دی یونیزه به مرکز ستون Qiaquick اضافه کرده و ستون به مدت ۱ دقیقه در ۱۳۰۰RPM سانتریفوژ گردید. پس از خالص نمودن DNA، غلظت آن با دستگاه نانودراپ اندازه گیری و برای اتصال به پلاسمید (واکنش Ligation) مورد استفاده قرار گرفت.

آزمایش ۲-۳-۳: اتصال قطعه SatDNA (۱۷۰bp) جدا شده به پلاسمید (واکنش Ligation)

واکنش Ligation طبق پروتکل کیت InsTAclone TM (Fermentas, Cat No. K1213) انجام شد. برای این کار ابتدا ۰/۱۶۵ میکروگرم پلاسمید PTZ57R/T، ۰/۰۲۵ میکروگرم (۴ میکرولیتر) قطعه DNA خالص شده، ۶ میکرولیتر Ligation buffer (۵×)، آب (عاری از نوکلئاز) تا ۳۰ میکرولیتر، آنزیم T4 DNA Ligase (۱ میکرولیتر، ۵واحد) را درون یک میکروتیوب ۱/۵ میلی لیتری ریخته و به مدت ۱۲ ساعت در انکوباتور ۲۲ درجه سانتیگراد قرار داده شد سپس به منظور ازدیاد پلاسمید نو ترکیب تولید شده، پلاسمید مذکور درون یک باکتری جای داده شد.

آزمایش ۳-۳-۳: وارد نمودن پلاسمید نو ترکیب در داخل باکتری *E. coli* (ترانسفورماسیون)

برای ترانسفورماسیون پلاسمید از باکتری *E. coli* (سویه DH5 α) استفاده شد. برای واکنش ترانسفورماسیون از کیت InsTAclone TM (Fermentas, Cat No. K1213) و از پروتکل ذکر شده در کیت مذکور استفاده شد. برای تهیه Competent cell با استفاده از کیت، پلیت LB حاوی باکتری به مدت یک شبانه روز در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده شد. دمای محیط کشت موجود در کیت (Transformaid TM medium C) را به دمای ۳۷ درجه سانتیگراد رسانده، مقدار کمی از باکتری را در محیط کشت مذکور تلقیح کرده و به مدت ۲ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده شد. به منظور وارد کردن پلاسمید به درون باکتری محیط کشت حاوی آمپی سیلین را به مدت ۲۰ دقیقه در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد قرار کرده، سپس محلول T solution (این محلول با ایجاد سوراخ در غشای باکتری آن را آماده پذیرفتن پلاسمید می کند) تهیه شد. برای تهیه آن حجم مساوی از T solution A و T solution B با هم ترکیب نموده و بر روی یخ قرار داده شد. سپس ۱/۵ میلی لیتر محیط کشت حاوی باکتری را در یک میکروتیوب ۱/۵ میلی لیتر ریخته و به مدت ۱ دقیقه در ۱۳۰۰ RPM سانتریفوژ شد. سپس مایع رویی را جدا کرده و Pellete (باکتری ته میکروتیوب) را در ۳۰۰ میکرولیتر از محلول T solution تهیه شده (T solution B + T solution A) حل کرده و به مدت ۵ دقیقه بر روی یخ قرار داده شد. محلول را دوباره سانتریفوژ کرده، محلول رویی را جدا کرده و سلولها را دوباره در ۱۲۰ میکرو لیتر محلول T solution حل کرده و به مدت ۵ دقیقه بر روی یخ قرار داده شد. پلاسمید نو ترکیب آماده شده برای ترانسفورماسیون (۲/۵ میکرو لیتر از محلول Ligation) را به میکروتیوب دیگر اضافه کرده و به مدت ۲ دقیقه بر روی یخ قرار داده شد. ۵۰ میکرو لیتر از سوسپانسیون سلولی را به میکروتیوب حاوی پلاسمید اضافه کرده و به مدت ۵ دقیقه بر روی یخ گذاشته شد. سلولها را روی پلیت حاوی آمپی سیلین، X-gal و IPTG (Iso-Propyl Thio Galactoside) کشت داده و به مدت یک شبانه روز در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده شد. به منظور تایید کلونینگ، کلونی های سفید PCR شدند، سپس محصول PCR با استفاده از ژل آگارز الکتروفورز گردید.

در مرحله بعد کشت شبانه باکتریهای حاوی پلاسمید در محیط کشت حاوی آمپی سیلین انجام شد و پلاسمید با استفاده از کیت Qiagen (Cat No. 27104) استخراج گردید و برای تعیین توالی فرستاده شد.

۳-۴- هیبریداسیون پروبهای نشاندار شده با کروموزومهای تاسماهی ایرانی و تاسماهی روسی (آزمایشات FISH)

۳-۴-۱- تهیه لامهای کروموزومی

از سوسپانسیونهای سلولی حاصل از کشت موفقیت آمیز گلبولهای سفید خون ماهیان مورد آزمایش لام گسترش کروموزومی تهیه شد. با توجه به اینکه تمیز کردن لامها قبل از تهیه گسترشهای کروموزومی ضروری است لذا:

- ابتدا لامها به مدت ۳ ساعت در محلول سفید کننده قرار داده شدند.
- لامها را با آب معمولی و با آب مقطر شسته، سپس در دمای آزمایشگاه خشک شدند.
- لامها را به مدت ۲ ساعت در اتانول ۹۶٪ قرار داده، سپس با یک پارچه بدون پرز خشک شدند.
- پس از تمیز نمودن لامها، تعداد ۲-۳ قطره از سوسپانسیونهای سلولی بر روی لامهای تمیز چکانده شد و در آزمایشگاه قرار داده شدند تا خشک شوند.
- لامهای خشک شده را بدون رنگ آمیزی با میکروسکوپ نوری معمولی (Nikon, Labophot) مورد مطالعه قرار داده و در صورت یافتن گسترشهای کروموزومی مناسب برای انجام آزمایشات FISH، محدوده آن بر روی لام با یک قلم الماسه علامت گذاری شد.

۳-۴-۲- پیش تیمار لامهای کروموزومی

برای انجام هیبریداسیون مناسب پروب با کروموزومهای ماهیان مورد آزمایش و اجتناب از هیبریداسیون ناخواسته پروب با مواد پروتئینی که ممکن است بطور اتفاقی در روی لام وجود داشته باشد لامهای تهیه شده به شرح ذیل پیش تیمار گردیدند:

- ۱- لامهای تهیه شده به مدت ۳-۵ دقیقه در محلول پپسین ۰/۰۵ درصد (پپسین حل شده در اسید کلریدریک ۰/۰۱ نرمال) با دمای ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده شدند.
- ۲- لامها را از پپسین خارج نموده، به مدت ۵ دقیقه در فیکساتیو ۴ درجه سانتیگراد قرار داده شدند.
- ۳- لامها را از فیکساتیو خارج نموده، به مدت ۵ دقیقه در محلول^۵ PBS قرار داده شدند.

^۵ Phosphate-buffered Saline

▪ برای تهیه PBS: ۷۶ گرم NaCl، ۱۲/۴۶ گرم Na_2HPO_4 و ۴/۶۸ گرم NaH_2PO_4 را با ۱۰۰۰ میلی لیتر آب مقطر مخلوط کرده، سپس pH آن با اسید کلریدریک یا سود نرمال به ۷/۴ رسانده شد.

۴- لامها را از محلول PBS خارج کرده، به مدت ۱۰ دقیقه درون محلول $2\times \text{SSC}$ با دمای 37°C قرار داده شدند.

▪ برای تهیه $2\times \text{SSC}$ مقدار ۷ml ماده $2\times \text{SSC}$ (کلرید سدیم ۳ M + سترات تری سدیم ۳۰۰mM) با ۶۳ml آب دی یونیزه مخلوط شد.

۵- لامها را از محلول $2\times \text{SSC}$ خارج نموده، سپس به مدت ۲ دقیقه در اتانول ۷۰٪ قرار داده شدند.

۶- لامها را از اتانول ۷۰٪ خارج نموده، سپس به مدت ۲ دقیقه در اتانول ۸۵٪ قرار داده شدند.

۷- لامها را از اتانول ۸۵٪ خارج نموده، سپس به مدت ۲ دقیقه در اتانول ۱۰۰٪ قرار داده شدند.

۸- لامها را از اتانول ۱۰۰٪ خارج نموده، سپس در آزمایشگاه قرار داده شدند تا خشک شوند.

۳-۴-۳- نشاندار کردن پروب

برای نشاندار کردن پروبهای تهیه شده از یک ماده فلوئوفور (fluorophore) به نام Orange-dUTP^۷ یا

Spectrum Orange و کیت مخصوص واکنش Nick Translation (Vysis, Cat No.32-801300) استفاده شد. مواد

موجود در کیت مذکور در جدول ۱۰ آورده شده است.

جدول ۱۰: مواد موجود در کیت (Vysis, Cat No.32-801300) Nick Translation Kit

ترکیب	حجم	مواد
DNA polymerase I, DNase in 50% glycerol, 50mM Tris-HCl, pH=7.2, 10mM MgSO ₄ , 0.1mM DTT, 0.5 mg/ml nuclease-free BSA	۵۲۵μl	Nick translation Enzyme
500mM Tris-HCl , pH=7.2, 100mM MgSO ₄ , 1mM DTT	۳۰۰ μl	10× Nick translation buffer
0.3 mM dTTP	۲۰۰ μl	dTTP
0.3 mM dCTP	۲۰۰ μl	dCTP
0.3 mM dATP	۲۰۰μl	dATP
0.3 mM dGTP	۲۰۰ μl	dGTP
-	۷/۵ml	Nuclease-free Water

^۷Saline Sodium Citrate یا Standard Saline Citrate

^۷ در صورت تابانده شدن نوری با طول موج ۵۵۹nm تحریک شده و نوری با طول موج ۵۸۸nm از خود گسیل می کند

نشاندن کردن پروب نیز طبق دستورالعمل کیت انجام شد که بدین منظور ابتدا مواد ذیل تهیه شدند :

۱- ابتدا مواد (0.2 mM) Spectrum Orange ، (0.1 mM) dTTP ، (0.1 mM) dNTP mix ، $0.1 \mu\text{g}$ ، پروب تهیه شده آماده گردید.

۲- یک عدد میکروتیوب را بر روی یخ قرار داده سپس $2/5$ میکرولیتر (0.2 mM) Spectrum Orange ، ۵ میکرولیتر (0.1 mM) dTTP ، ۱۰ میکرولیتر (0.1 mM) dNTP mix ، ۵ میکرولیتر 10× Nick translation buffer ، ۱۰ میکرولیتر Nick translation enzyme ، X میکرولیتر ($0.1 \mu\text{g}$) پروب تهیه شده و X-۱۷/۵ میکرولیتر آب عاری از نوکلئاز را درون آن ریخته، به آرامی ورتکس شد.

۳- میکروتیوب به مدت ۱۶ ساعت در انکوباتور 15°C قرار داده شد.

۴- به منظور متوقف شدن واکنش، میکروتیوب به مدت ۱۰ دقیقه در بن ماری 70°C ، سپس بر روی یخ قرار داده شد.

۵- به پروب نشاندن شده مقدار $50 \mu\text{l}$ محلول هیبریداسیون (۷۰% Formamide حل شده در $2\times\text{SSC}$ ، pH=7-8) اضافه شد.

با توجه به اینکه قبلاً نتیجه هیبریداسیون SatDNA خویشاوندی استخراج شده از تاسمای روسی با کروموزومهای ماهی مذکور توسط Lanfredi و همکارانش (۲۰۰۱) بررسی شده بود لذا به منظور امکان مقایسه نتایج کسب شده در این تحقیق با نتایج کسب شده توسط محققین مذکور، در این تحقیق فقط نشانگذاری و هیبریداسیون پروب بدست آمده از تاسماهی روسی با کروموزومهای تاسماهی ایرانی و تاسماهی روسی انجام شد

۴-۳- هیبریداسیون پروب با کروموزومها

همانطوریکه قبلاً گفته شد اساس تکنیک FISH استفاده از پروبهای نشاندن شده و اتصال آن به DNA هدف که ممکنست کروموزومهای تثبیت شده بر روی لام باشد است. بنابراین ابتدا دو رشته DNA کروموزومی و پروب باید دناتوره (واسرشته سازی) شود لذا بدین منظور:

- پس از خشک شدن لامها در دمای آزمایشگاه، ۱۰ میکرولیتر محلول هیبریداسیون حاوی پروب را بر روی مکانهای علامت گذاری شده بر روی لام ریخته و پس از گذاشتن لام $18\times 18\text{mm}$ بر روی آن، به منظور جلوگیری از تبخیر محلول هیبریداسیون حاوی پروب دورتا دور لامل با چسب مایع پوشانده شد.

- به منظور دناتوره کردن (واسرشته سازی) پروب و کروموزومها، لامها به مدت ۵ دقیقه در دمای 75°C قرار داده شدند.
- پس از قرار دادن لام بر روی کف مرطوب یک محفظه فلزی، تا صبح روز بعد در انکوباتور 37°C قرار داده شدند.

۵-۴-۳- شستشوی لامها پس از هیبریداسیون

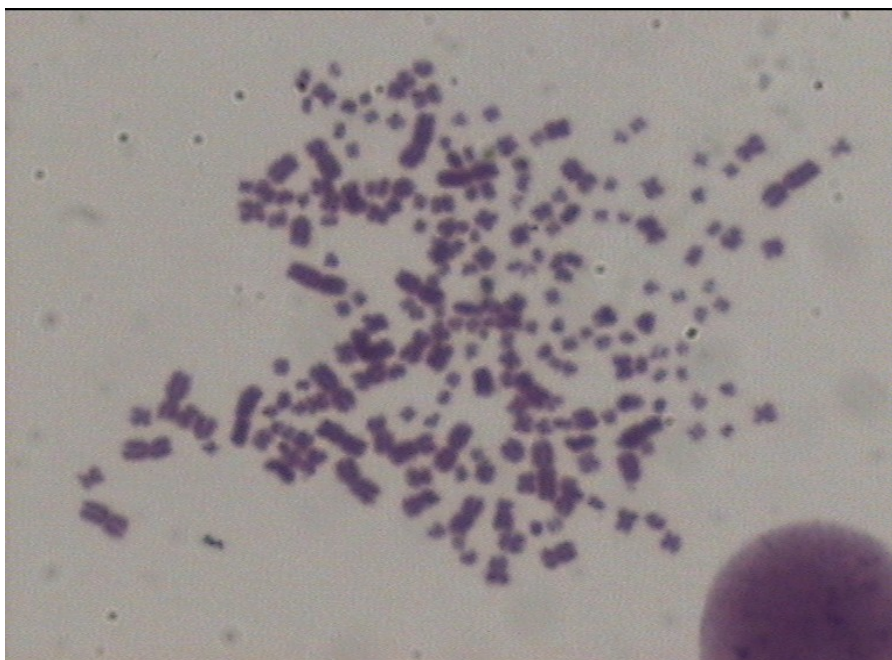
- پس از هیبریداسیون پروب با کروموزومها، لامها شسته شدند تا محلول هیبریداسیون و پروبهای اضافی از لام زدوده شود. بدین منظور:
- پس از گذشت ۱۶ ساعت، لام را از روی لام برداشته و لام به مدت ۲ دقیقه در $0.4\times\text{SSC}$ دارای دمای 73°C قرار داده شد.
- لام را به مدت ۱ دقیقه در $2\times\text{SSC}$ حاوی 0.05% Tween20 دارای دمای آزمایشگاه قرار داده شد. پس از خشک شدن لامها در دمای آزمایشگاه، به آن مقدار $10\mu\text{l}$ رنگ DAPI حاوی ماده تثبیت کننده رنگ (antifade) اضافه شد و پس از خشک شدن در دمای آزمایشگاه، لامها با استفاده از میکروسکوپ فلوئورسنس (Nikon Eclips 800 Cytovision) مورد بررسی میکروسکوپی قرار گرفتند و تعداد نقاط رنگی حاصل از هیبریداسیون پروب نشاندار با کروموزومهای ماهیان مورد آزمایش در ۱۲ عدد متافاز مربوط به ۳ عدد ماهی از هر گونه انجام شد.

طی انجام این طرح در کل تعداد ۱۴ آزمایش مربوط به **تکنیک FISH** انجام شد که تعداد ۸ آزمایش مربوط به قبل از دستیابی به روش کار و مشاهده اولین سیگنالها بر روی کروموزومهای ماهیهای مورد آزمایش و تعداد ۶ آزمایش پس از دستیابی به روش کار در مورد ماهیان مورد آزمایش انجام شد.

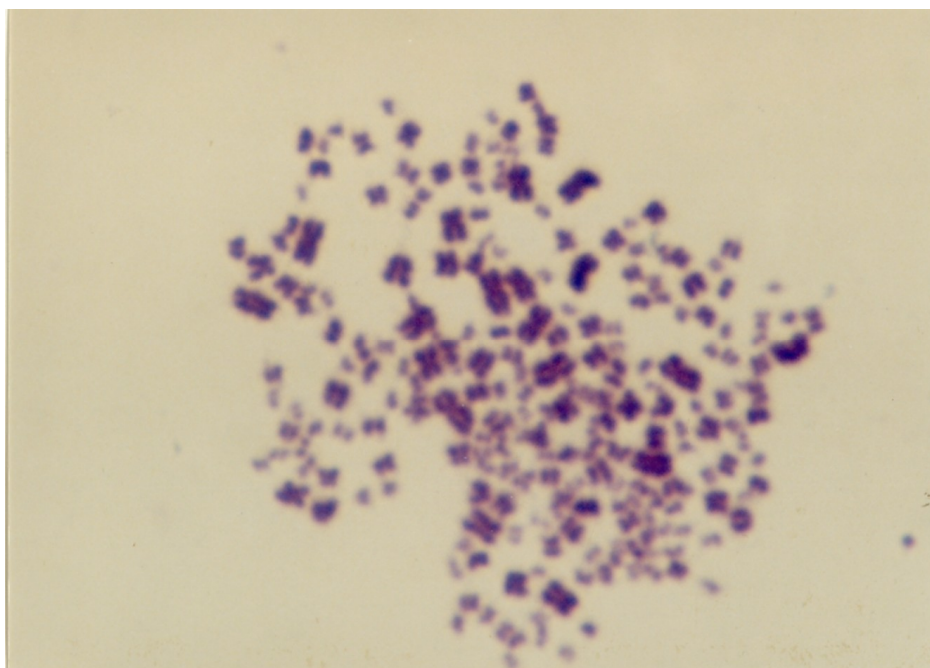
۴- نتایج

۴-۱- نتایج کسب شده در کشت خون ماهیان مورد آزمایش

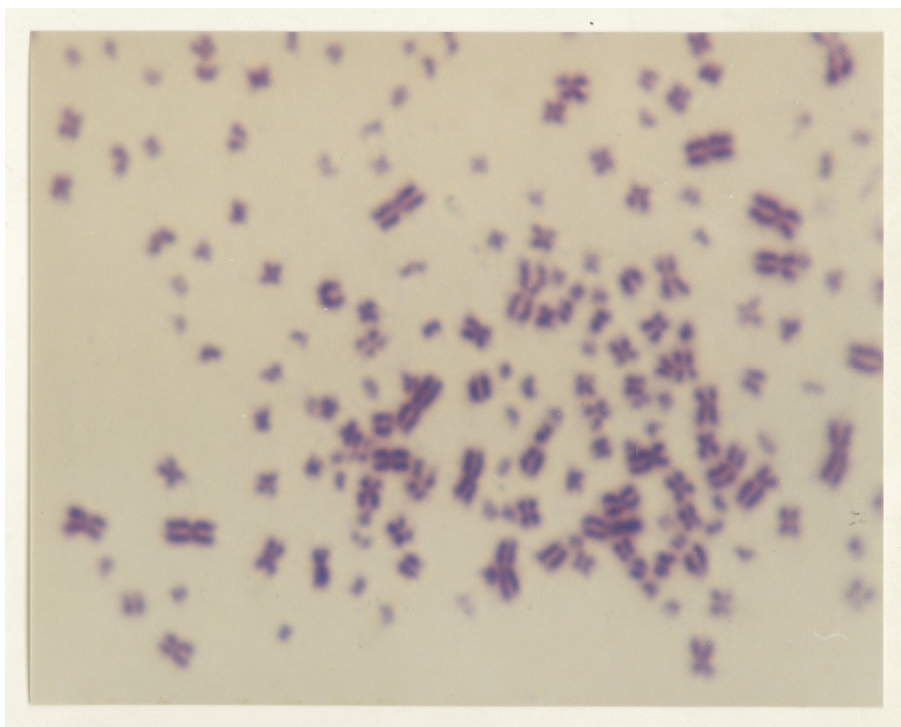
در نتیجه کشت موفقیت آمیز گلبولهای سفید خون ماهیهای مورد آزمایش، در لامهای تهیه شده از نمونه های کشت داده شده گسترشهای کروموزومی مناسبی تهیه شد که تعدادی از آنها دارای کیفیت مناسبی برای رنگ آمیزی FISH بودند (شکلهای ۵، ۶، ۷، ۸، ۹).



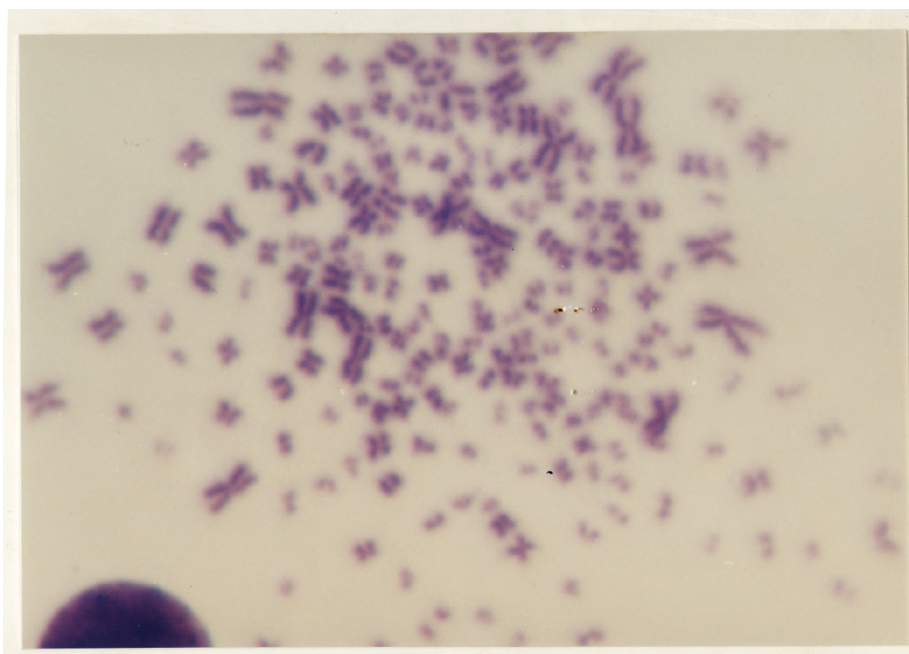
شکل ۵- گسترش کروموزومی تاسماهی ایرانی (×۱۰۰۰)



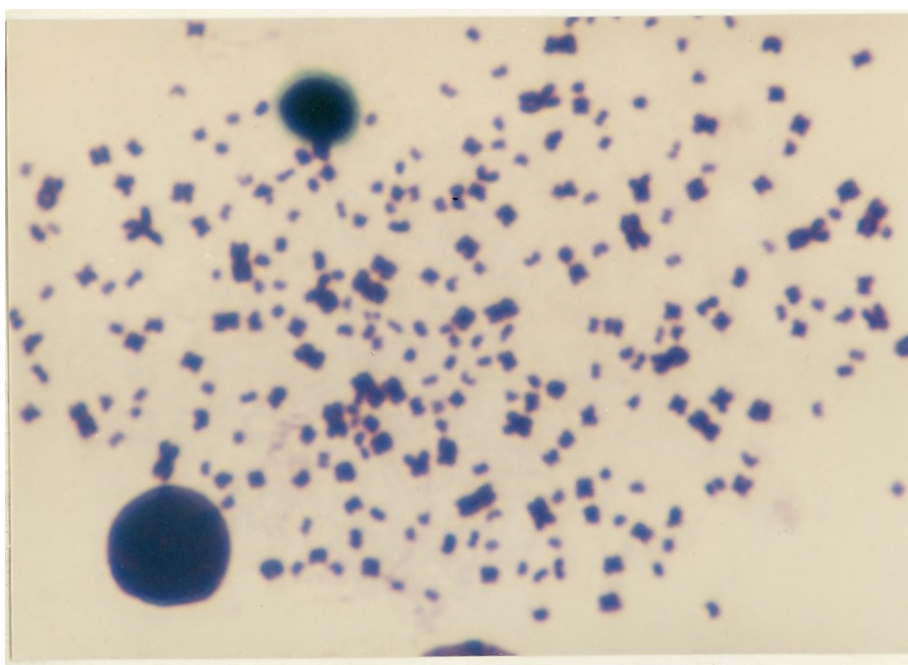
شکل ۶- گسترش کروموزومی تاسماهی ایرانی (×۱۰۰۰)



شکل ۷- گسترش کروموزومی تاسماهی ایرانی (×۱۰۰۰)



شکل ۸- گسترش کروموزومی تاسماهی روسی (×۱۰۰۰)



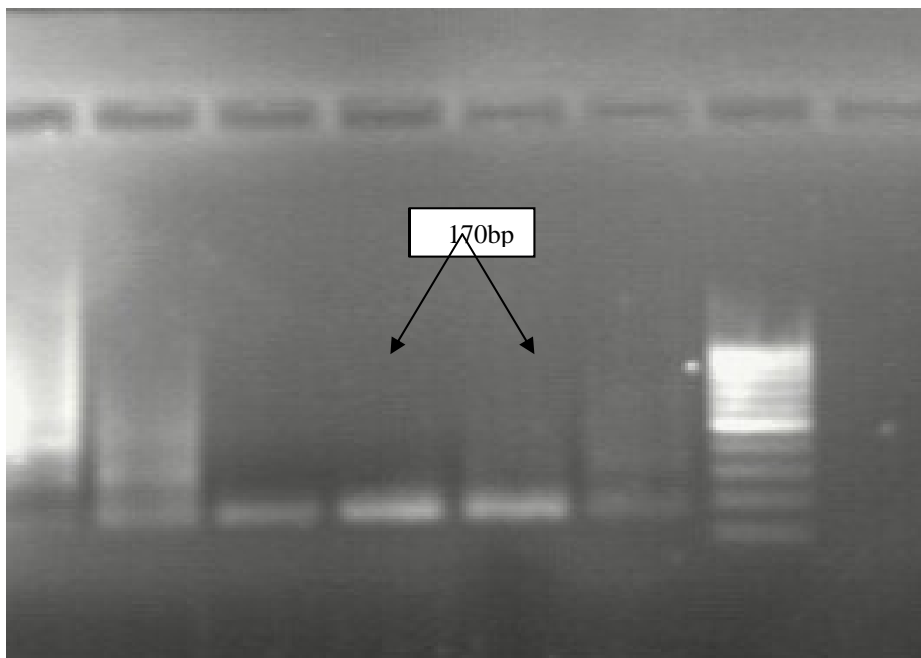
شکل ۹- گسترش کروموزومی تاسماهی روسی (×۱۰۰۰)

با کشت موفقیت آمیز گلبولهای سفید خون تاسماهی روسی و بدست آوردن گسترشهای کروموزومی مناسب از این ماهی و با توجه به بدست آوردن روش کار کشت خون سایر تاسماهیان دریای خزر در مطالعات قبلی، ترکیب محیط کشت مناسب و روش کار برای کشت خون ۶ گونه تاسماهی متعلق به دریای خزر بدست آمد.

۲-۴- نتایج مربوط به تهیه پروب

۳-۲-۱ نتیجه آزمایش

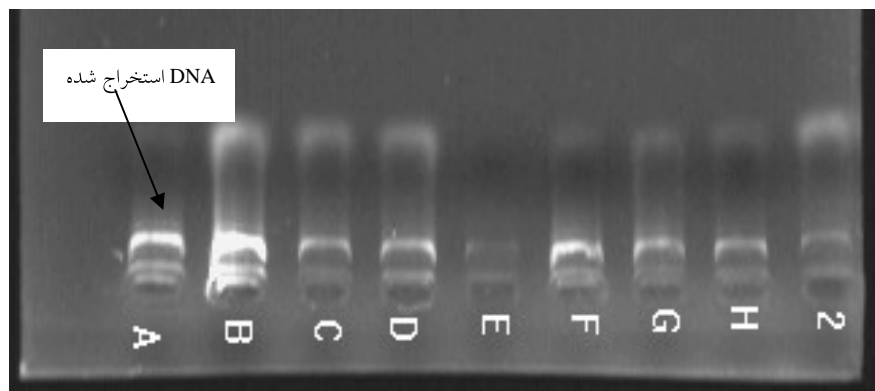
در نتیجه انجام واکنش PCR و الکتروفورز محصول PCR با استفاده از ژل آگارز بر روی ژل یک باند در محدوده ۱۷۰bp و یک باند خیلی ضعیف مشاهده شد (شکل ۱۰).



شکل ۱۰- الکتروفورز محصول PCR بر روی ژل آگارز ۲٪ پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید

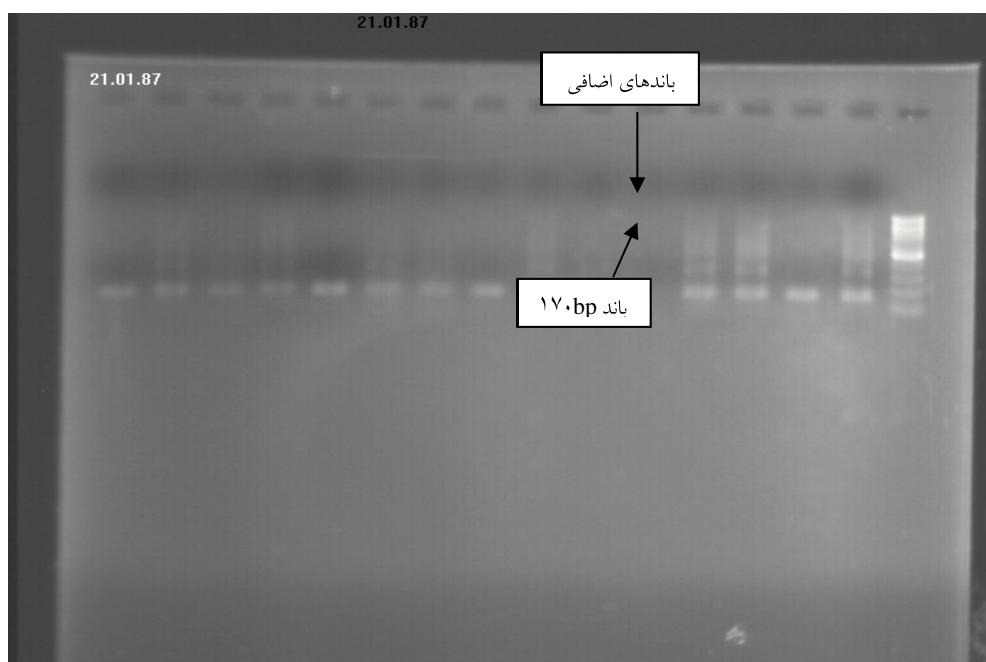
۳-۲-۲ نتیجه آزمایش

DNA استخراج شده از ماهیان مورد آزمایش دارای کیفیت مناسب بودند (شکل ۱۱)



شکل ۱۱- بررسی کیفیت DNA استخراج شده از تاسماهیان ایرانی مورد آزمایش با استفاده از ژل آگارز ۲٪، هر کدام از حروف نمایانگر نمونه ماهی مورد آزمایش می باشد.

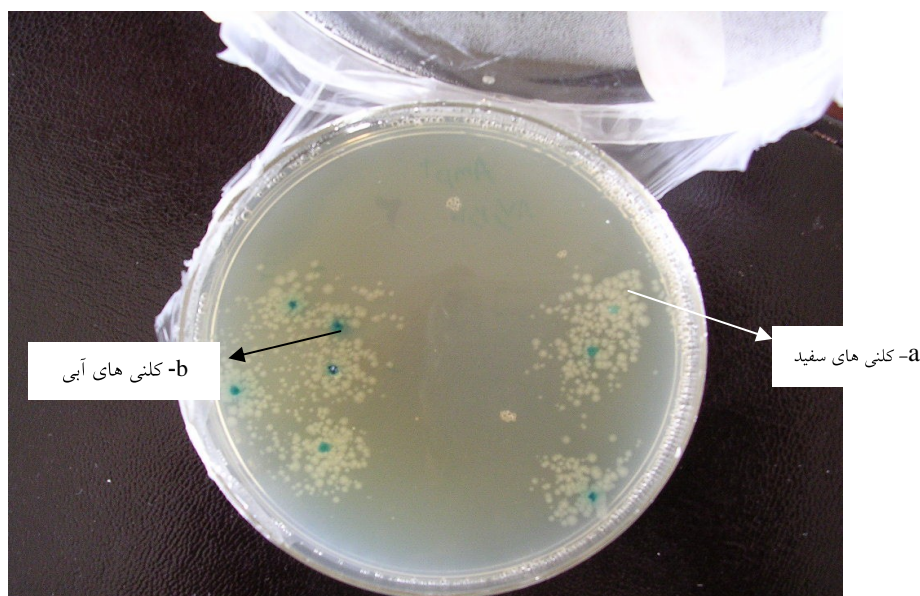
بر روی ژل آگارز ۲ باند مشاهده شد که باند اصلی در محدوده ۱۷۰bp بود (شکل ۱۲).



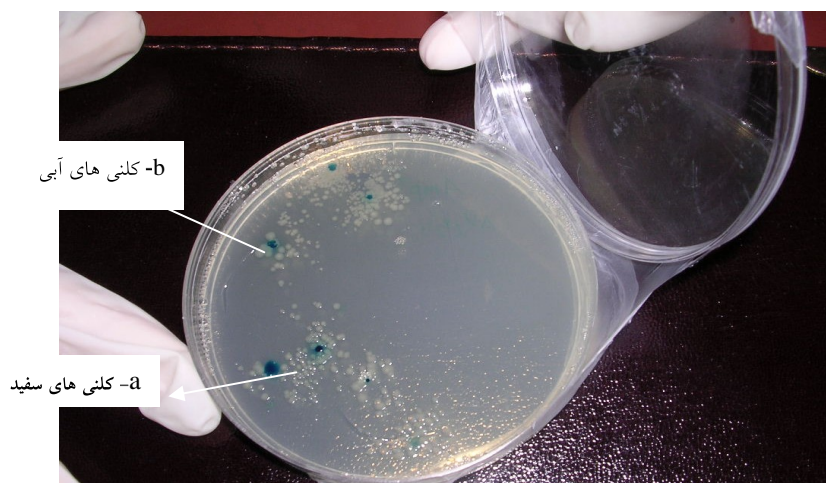
شکل ۱۲- الکتروفورز محصول PCR بر روی ژل آگارز ۲٪ پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید

۳-۴- نتایج مربوط به کلونینگ

نتیجه آزمایش ۳-۳-۳: بررسی پلیتها (شکلهای ۱۳ و ۱۴) و ژلهای حاصل از PCR کلونی ها (شکلهای ۱۵ و ۱۶) حاکی انجام کلونینگ مثبت در بیشتر کلونی ها بود.



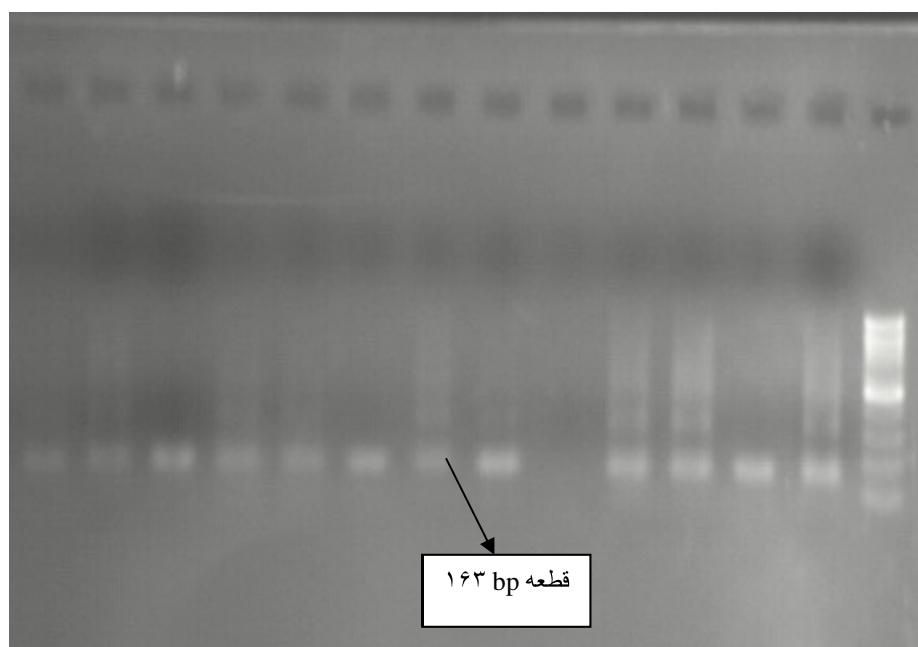
شکل ۱۳- باکتری های تکثیر شده بر روی محیط کشت
a- کلنی آبی نمایانگر باکتریهای فاقد قطعه ۱۶۸bp می باشد
b- کلنی سفید نمایانگر باکتری حاوی قطعه ۱۶۸bp می باشد



شکل ۱۴- باکتری های تکثیر شده بر روی محیط کشت
a- کلنی آبی نمایانگر باکتریهای فاقد قطعه ۱۶۸bp می باشد
b- کلنی سفید نمایانگر باکتری حاوی قطعه ۱۶۸bp می باشد



شکل ۱۵- الکتروفورز محصول PCR مربوط به پلاسمید نو ترکیب حاوی قطعه ۱۶۸bp استخراج شده از تاسماهی روسی بر روی ژل آگارز ۲٪ پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید



شکل ۱۶- الکتروفورز محصول PCR مربوط به پلاسمید نو ترکیب حاوی قطعه ۱۶۳bp استخراج شده از تاسماهی ایرانی بر روی ژل آگارز ۲٪ پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم

نتایج حاصل از تعیین توالی قطعات ژنی در پلاسمیدهای نوترکیب (حاوی یک قطعه SatDNA) منجر به دستیابی به دو توالی ۱۶۸ و ۱۶۳ جفت بازی به ترتیب در تاسماهی روسی و تاسماهی ایرانی گردید که توالیهای مذکور در بانک ثبت ژن NCBI⁸ به ترتیب با شماره های FJ594465 و FJ429174 به ثبت رسیده است.

GenBank: FJ594465.1

Acipenser gueldenstaedtii satellite HindIII sequence

LOCUS FJ594465 168 bp DNA linear VRT 02-FEB-2009

DEFINITION Acipenser gueldenstaedtii satellite HindIII sequence.

ACCESSION FJ594465

VERSION FJ594465.1 GI:222107505

KEYWORDS .

SOURCE *Acipenser gueldenstaedtii* (Russian sturgeon)

ORGANISM *Acipenser gueldenstaedtii*

Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;

Actinopterygii; Chondrostei; Acipenseriformes; Acipenseridae;

Acipenser.

REFERENCE 1 (bases 1 to 168)

AUTHORS Nowrouz Fashkhami, M. R., Jahani, M. and Kazemi, B.

TITLE Comparison of satellite DNA between Russian sturgeon (*Acipenser gueldenstaedtii*) and Iranian sturgeon (*Acipenser persicus*)

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 168)

AUTHORS Nowrouz Fashkhami, M.R., Jahani, M. and Kazemi, B.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted(24-DEC-2008)Genetic, International Sturgeon Institute, Sade Sangar, Rasht, Guilan +98, Iran

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..168

/organism="Acipenser gueldenstaedtii"

/mol_type="genomic DNA"

/db_xref="taxon:7902"

repeat region 1..168

/satellite="satellite: HindIII"

ORIGIN

1 cttaccgatt cggctctgtc aagaaaacac attttttga tctcagaact ccaaatttta

61 gcttccccctt ttttgaaaa agggggctgg tcgggtctg acaaaaaaat aataattttg

121 gccaatTTta tttttcgga acttcaatgc cccagcttt tgaaaaag

⁸National Center for Biotechnology Information

GenBank: FJ429174.1

Acipenser persicus clone I satellite HindIII sequence

LOCUS FJ429174 163bp DNA linear VRT 18-NOV-2008

DEFINITION Acipenser persicus clone I satellite HindIII sequence.

ACCESSION FJ429174

VERSION FJ429174.1 GI:213268258

KEYWORDS .

SOURCE *Acipenser persicus* (Persian sturgeon)

ORGANISM Acipenser persicus

Eukaryota;Metazoa;Chordata;Craniata;Vertebrata; Euteleostomi;

Actinopterygii; Chondrostei; Acipenseriformes; Acipenseridae;

Acipenser.

REFERENCE 1 (bases 1 to 163)

AUTHORS Nowruzfashkhami, M. R., Pourkazemi, M., Kazemi, B. and Azizzadeh Pormehr, L.

TITLE Comparison of satellite DNA between Russian sturgeon (*Acipenser guldenstatti*) and Iranian Sturgeon (*Acipenser persicus*)

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 163)

AUTHORS Nowruzfashkhami, M. R., Pourkazemi, M., Kazemi, B. and Azizzadeh Pormehr, L.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted(28-OCT-2008)Genetic,International Sturgeon Institute, Sade Sangar,Rasht,Guilan, Iran

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..163

/organism="Acipenser persicus"

/mol_type="genomic DNA"

/db_xref="taxon:61968"

/clone="I"

/tissue_type="fin"

/note="PCR_primers=fwd_name: Sat1, rev_name: Sat2"

repeat region 1..163

/rpt_type=tandem

/satellite="satellite:HindIII"

ORIGIN

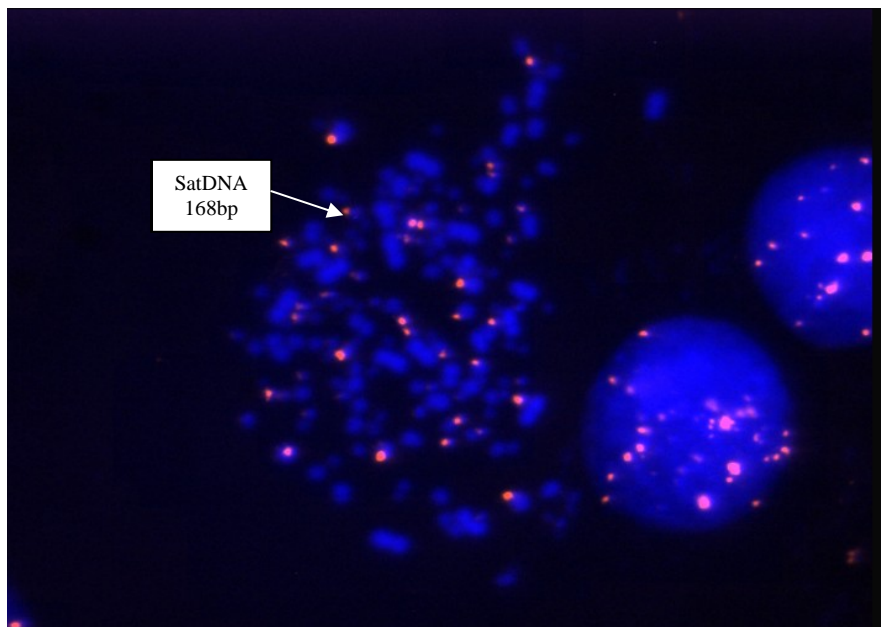
1 aaaagctcgg ggcattgaaa ttagaaatta ggaaaaaata aaattctcca aaatttaatt

61 tttttgacag gaccggaccc gtccctttt tcaaaaaagg gggatgtcta aattggggag

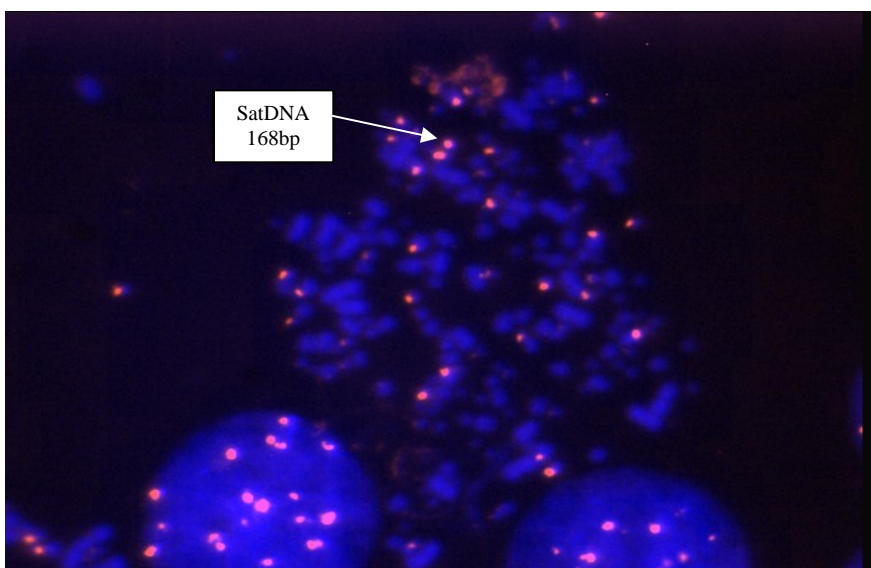
121 ttcggaagac caaaaaattg tgtttcttg acaggaacga acc

۴-۴- نتایج مربوط به هیبریداسیون پروب با کروموزومهای ماهیان مورد آزمایش (آزمایشات FISH)

بررسی لامها با میکروسکوپ فلئورسنت حاکی از وجود سیگنالهای صورتی رنگ حاصل از اتصال SatDNA خویشاوندی با کروموزومهای ماهیان مورد آزمایش بود (اشکال ۱۷ و ۱۸).



شکل ۱۷- علایم مربوط به SatDNA خویشاوندی هیبرید شده با کروموزومهای تاسماهی روسی ($\times 1000$)



شکل ۱۸- علایم مربوط به SatDNA خویشاوندی هیبرید شده با کروموزومهای تاسماهی ایرانی ($\times 1000$)

در نتیجه شمارش نقاط رنگی حاصل از هیبریداسیون پروب نشاندار شده با کروموزومها در ۱۲ عدد گسترش کروموزومی متعلق به ۳ عدد تاسماهی ایرانی، میانگین تعداد نقاط شمارش شده 67 ± 3 عدد تعیین گردید (جدول ۱۱).

جدول ۱۱- تعداد نقاط هیبریداسیون مشاهده شده در متافازهای بررسی شده تاسماهی ایرانی

شماره	تعداد نقاط مشاهده شده در متافازهای بررسی شده				$X \pm SD$
	متافاز شماره ۱	متافاز شماره ۲	متافاز شماره ۳	متافاز شماره ۴	
۱	۶۹	۶۴	۶۸	۶۲	$65/75 \pm 3/30$
۲	۶۸	۷۱	۶۹	۷۰	$69/50 \pm 1/29$
۳	۶۲	۶۶	۶۸	۷۱	$66/75 \pm 3/77$
میانگین					$67/33 \pm 2/79$

همچنین در نتیجه شمارش نقاط رنگی حاصل از هیبریداسیون پروب نشاندار شده با کروموزومها در ۱۲ عدد گسترش کروموزومی متعلق به ۳ عدد تاسماهی روسی، میانگین تعداد نقاط شمارش شده 68 ± 4 عدد تعیین گردید (جدول ۱۲).

جدول ۱۲- تعداد نقاط هیبریداسیون مشاهده شده در متافازهای بررسی شده تاسماهی روسی

شماره	تعداد نقاط مشاهده شده در متافازهای بررسی شده				$X \pm SD$
	متافاز شماره ۱	متافاز شماره ۲	متافاز شماره ۳	متافاز شماره ۴	
۱	۶۸	۷۳	۷۲	۶۴	$69/25 \pm 4/11$
۲	۷۱	۶۹	۶۲	۷۰	$68 \pm 4/08$
۳	۶۵	۶۸	۷۱	۶۳	$66/75 \pm 3/50$
میانگین					$68 \pm 3/90$

تعیین دقیق نوع کروموزومها و محل قرار گرفتن پروبها بر روی کروموزومهای ماهیان مورد آزمایش امکانپذیر نبود.

۵- بحث

طبق نتایج کسب شده در این تحقیق اثر میتوزنی ماده فیتوهاگلوتینین نوع M (PHA-M) بر گلبولهای سفید کشت داد شده ماهیان مورد آزمایش بیش از فیتوهاگلوتینین نوع L (PHA-L) و فیتوهاگلوتینین نوع P (PHA-P) بود. خاصیت میتوزنی PHA-M تولیدی شرکت Gibco نیز موثرتر از PHA-M تولیدی شرکت Sigma بود.

قبلاً از ماده فیتوهاگلوتینین برای تحریک تقسیمات میتوزی لکوسیت‌های کشت داده شده فیلماهی، ماهی ازون برون (نوروزفشخامی و خسروشاهی، ۱۳۷۴)، تاسماهی سفید (Van nnaam, ۹۹۸a)، تاسماهی ایرانی (Nowruzfashkhami et al., ۲۰۰۰)، تاسماهی سفید و ماهی Bester (دو رگه حاصل از تلاقی فیلماهی ماده و استرلیاد نر) توسط Fojiwara (۲۰۰۱) و تاسماهی شپ (نوروزفشخامی، ۱۳۸۴) استفاده شد.

Eenennaam (۱۹۹۸) استفاده از $200 \mu\text{gml}^{-1}$ ماده PHA-W را برای کشت لکوسیت‌های تاسماهی سفید توصیه نمود. نوروزفشخامی و خسروشاهی (۱۳۷۴) استفاده از $10 \mu\text{gml}^{-1}$ ماده PHA-P را برای کشت لکوسیت‌های فیل ماهی و ماهی ازون برون، همچنین Nowruzfashkhami و همکارانش (۲۰۰۰) استفاده همین مقدار از ماده مزبور را برای کشت لکوسیت‌های تاسماهی ایرانی توصیه نمودند. Fujiwara و همکارانش (۲۰۰۱) معتقدند استفاده از $18 \mu\text{gml}^{-1}$ ماده PHA-W یا $1/5 \mu\text{gml}^{-1}$ از ماده PHA-P در محیط کشت باعث القای بیشترین تقسیمات میتوزی در لکوسیت‌های کشت داده شده تاسماهی سفید و ماهی دو رگه بستر می گردد. نوروزفشخامی (۱۳۸۴) گزارش نمود استفاده از $40 \mu\text{gml}^{-1}$ ماده PHA-P در محیط کشت بیشترین شاخص میتوزی را در لکوسیت‌های کشت داده شده ماهی شپ تولید می نماید.

طبق تجارب کسب شده در این تحقیق، استفاده از $0/4 \text{ml}$ ماده PHA-M (Gibco) در محیط کشت بهترین و موثر ترین دز برای موفقیت آمیز بودن کشت لکوسیت‌های ماهیان مورد آزمایش بود.

همچنین در طول انجام پروژه مشاهده گردید تحت شرایط کاملاً یکسان، همواره تکثیر لکوسیت‌های کشت داده شده تاسماهی ایرانی با سهولت بیشتری نسبت به لکوسیت‌های تاسماهی روسی انجام می شد و میزان کسب موفقیت در کشت دادن لکوسیت‌های تاسماهی ایرانی همواره بیش از تاسماهی روسی بود.

پروپ مورد استفاده در این تحقیق یک DNA ماهواره ای (SatDNA) با ۱۶۸ جفت باز بود که از ژنوم تاسماهی روسی مورد آزمایش استخراج گردید. این DNA ماهواره ای اولین بار با استفاده از آنزیم *HindIII* توسط

Garrido-Ramos و همکارانش (۱۹۹۷) از ژنوم تاسماهی آدریاتیک جدا شد. بعدها SatDNA فوق الذکر توسط محققین مختلف از ژنوم تعدادی از گونه های جنس *Acipenser* بجز تاسماهی اروپا استخراج و تعیین توالی شد. *HindIII* StaDNA جدا شده توسط De La Herran و همکارانش (۲۰۰۱) از تاسماهی استرلیاد دارای ۱۷۱bp، تاسماهی آدریاتیک ۱۷۰bp و ۱۷۱bp، تاسماهی روسی ۱۶۹bp، ۱۷۰bp، ۱۷۱bp، تاسماهی سیری ۱۶۶bp، ۱۶۹bp، ۱۷۰bp، ۱۷۱bp و تاسماهی سفید ۱۶۹bp، ۱۷۰bp، ۱۷۱bp و *HindIII* StaDNA جدا شده توسط Robles و همکارانش (۲۰۰۴) از ماهی ازون برون دارای ۱۶۹bp، تاسماهی دریاچه ای ۱۷۱bp، تاسماهی پوزه کوتاه ۱۷۰bp، ۱۷۱bp و تاسماهی چینی ۱۷۰bp و ۱۶۴bp بود. حداقل و حداکثر تعداد بازهای *HindIII* StaDNA جدا شده از ماهیان مذکور نیز به ترتیب ۱۶۴bp و ۱۷۱bp بود. و تعداد بازهای SatDNA مذکور در تاسماهیان ۱۲۰ و ۲۴۰ کروموزومی علیرغم اختلاف در تعداد کروموزومها و سطح پلویدی نیز تقریباً یکسان بود (جدول ۱۳).

جدول ۱۳ - DNA ماهواره ای (SatDNA) جدا شده از تعدادی از گونه های ۱۲۰

کروموزومی (گروه A) و گونه های ۲۴۰ کروموزومی (گروه B) جنس *Acipenser* (منبع: بانک ثبت ژن NCBI)

گروه	گونه ها	توالی SatDNA	منابع
A	<i>Acipenser ruthenus</i>	171bp	De La Herran, R., Fontana, F., Lanfredi, M., Congiu, L., Leis, M., Rossi, R., Ruiz Rejon, C., Ruiz Rejon, M. and Garrido-Ramos, M. A., 2001
	<i>A. naccarii</i>	170bp 171bp	
	<i>A. stellatus</i>	169 bp	Robles, F. de la Herran, R., Ludwig, A., Ruiz Rejon, C., Ruiz Rejon, M. and Garrido-Ramos, M. A. 2004
B	<i>A. gueldenstaedtii</i>	169 bp 170bp 171bp	De La Herran, R., Fontana, F., Lanfredi, M., Congiu, L., Leis, M., Rossi, R., Ruiz Rejon, C., Ruiz Rejon, M. and Garrido-Ramos, M. A., 2001
	<i>A. baeri</i>	166bp 169bp 170bp 171bp	
	<i>A. transmontanus</i>	169bp 170bp 171bp	
	<i>A. fulvescens</i>	171 bp	Robles, F. De la Herran, R., Ludwig, A., Ruiz Rejon, C., Ruiz Rejon, M. and Garrido-Ramos, M. A. 2004
	<i>A. brevirostrum</i>	170bp 171bp	
	<i>A. sinensis</i>	170 bp 164bp	

HindIII StaDNA موجود در تاسماهیان ابزار خوبی را برای بررسی فیلوژنی این ماهیان فراهم نموده است تا جاییکه Ruiz-Rejon و همکارانش (۲۰۰۰) از آن برای بررسی رابطه فیلوژنی تاسماهی آدریاتیک، تاسماهی سیری، تاسماهی اروپا و فیلماهی استفاده نمودند. بر اساس نتایج کسب شده توسط این محققین به علت عدم وجود SatDNA مذکور در تاسماهی اروپا باید این گونه را از جنس *Acipenser* خارج نمود و فیلماهی را به واسطه دارا بودن SatDNA مذکور باید گونه ای از جنس *Acipenser* تلقی کرد. آنها به واسطه وجود تنها ۲/۳٪ اختلاف در توالی *HindIII* SatDNA استخراج شده از تاسماهی آدریاتیک و تاسماهی سیری، وجود رابطه فیلوژنی نزدیک بین این دو گونه را گزارش نمودند و بالاخره آنها اعلام نمودند که *HindIII* StaDNA موجود در تاسماهیان می تواند ابزار مولکولی مناسبی برای تشخیص گونه های مختلف تاسماهیانی باشد که در نقاط مختلف صید می شوند.

De La Herran و همکاران (۲۰۰۱) نیز وجود *HindIII* SatDNA و الگوی تکاملی آن را در تاسماهی آدریاتیک، تاسماهی سیری، تاسماهی استرلیاد، تاسماهی اروپا، تاسماهی سفید، تاسماهی روسی و فیلماهی بررسی کردند. نتایج بررسیهای این محققین نشان داد به واسطه وجود توالی *HindIII* SatDNA در فیلماهی آن را باید گونه ای از جنس *Acipenser* محسوب نمود و از طرف دیگر تاسماهی اروپا به دلیل نداشتن SatDNA متعلق به جنس *Acipenser* نیست و متعلق به زنجیره تکاملی مجزایی است. *HindIII* SatDNA تاسماهی روسی و تاسماهی آدریاتیک تقریباً یکسان است و شباهت بسیار زیادی را با تاسماهی سیری نشان می دهند. با توجه به تشابه موجود، باید این سه گونه را به همراه تاسماهی سفید در یک گروه قرار داد. ماهی استرلیاد و فیلماهی نیز در گروهی جداگانه قرار می گیرند.

توالی SatDNA استخراج شده از ژنوم تاسماهی روسی در تحقیق حاضر (Ag_2)، با توالی SatDNA استخراج شده از ژنوم تاسماهی روسی توسط De La Herran و همکارانش (Ag_1) (۲۰۰۱) دارای ۸۸٪ تشابه بود به عبارت دیگر در ۱۵۱ جفت باز مشابه همدیگر بودند و دارای ۱۲٪ (۱۵ جفت باز) با یکدیگر اختلاف داشتند (جدول ۱۴).

جدول ۱۴- مقایسه توالی SatDNA استخراج شده از ژنوم تاسماهی روسی در این طرح (A.g₂) با SatDNA استخراج شده از ژنوم تاسماهی روسی توسط De La Herran و همکارانش (A.g₁) (۲۰۰۱)

A.g ₁	1	CTTTTTCAAAAAGCTCGGGGCATTGAAATTATGAAAAAATAAAAATTGGCCAAAATTATTAT	60
A.g ₂	168	CTTTTTCAAAAAGCTGGGGGCATTGAAGTTCCGAAAAAATAAAAATTGGCCAAAATTATTAT	109
A.g ₁	61	TTTTT-GACAGGACCGGACCAGACCA-TTTTTCAAAAAAGGGGGATGTCTAAATTTTGGT	118
A.g ₂	108	TTTTTTGTCAGGACCCGACCAGCCCCCTTTTTCAAAAAAGGGGAAG-CTAAATTTTG-	51
A.g ₁	119	AGTTCTGAAGATCAAAAAATTGTGTTTTCTTGACAGGAACGAACCTGTAAG	169
A.g ₂	50	AGTTCTGA-GATCAAAAAAATGTGTTTTCTTGACAGGACCGAATCGGTAAG	1

تا قبل از انجام این طرح، گزارشی در ارتباط با شناسایی، استخراج و تعیین توالی SatDNA *HindIII* در تاسماهی ایرانی موجود نبود و این بررسی اولین گزارش در مورد بررسی SatDNA مذکور در این گونه است. SatDNA استخراج شده از تاسماهی ایرانی در تحقیق حاضر دارای ۱۶۳ جفت باز بود و با توالی SatDNA جدا شده از تاسماهی روسی توسط De La Herran و همکارانش (Ag₁) (۲۰۰۱) دارای ۸۷٪ تشابه بود و در ۱۴۴ جفت باز مشابه همدیگر بودند (جدول ۱۵) و با توالی جدا شده از تاسماهی روسی طی این تحقیق دارای ۸۱٪ تشابه بود به عبارت دیگر در ۱۳۲ جفت باز مشابه همدیگر بودند (جدول ۱۶).

جدول ۱۵- مقایسه توالی SatDNA استخراج شده از ژنوم تاسماهی ایرانی (A.p) در این طرح با SatDNA استخراج شده از ژنوم تاسماهی روسی توسط De La Herran و همکارانش (A.g₁) (۲۰۰۱)

A.g ₁	8	AAAAGCTCGGGGCATTGAAATT----A-T--GAAAAAATAAAAATTGGCCAAAA-TTATTA	59
A.p	1	AAAAGCTCGGGGCATTGAAATTAGAAATTAGGAAAAAATAAAAATTCTCCAAAATTTAAT-	59
A.g ₁	60	TTTTTTGACAGGACCGGACCAG-ACCATTTTTCAAAAAAGGGGGATGTCTAAATTTTGGT	118
A.p	60	TTTTTTGACAGGACCGGACCCGTCCCCTTTTTCAAAAAAGGGGGATGTCTAAA-TTGGGG	118
A.g ₁	119	AGTTCTGAAGATCAAAAAATTGTGTTTTCTTGACAGGAACGAACC	163
A.p	119	AGTTCGGAAGACCAAAAAATTGTGTTTTCTTGACAGGAACGAACC	163

جدول ۱۶- مقایسه توالی SatDNA استخراج شده از ژنوم تاسماهی ایرانی
(A.p) و ژنوم تاسماهی روسی در این طرح

A.g ₁	1	AAAAGCTCGGGGCATTGAAATTAGAAATTAGGAAAAAATAAAATTCTCCAAAATT-TAAT	59
A.p	161	AAAAGCTGGGGGCATTGAAGTTCC-----GAAAAAATAAAATTGGCCAAAATTATTAT	109
A.g ₁	60	ttttttGACAGGACCGGACCCGTCCTTTTTCAAAAAAGGGGGATGTCTAAATTGGGGA	119
A.p	108	TTTTTTGTCAGGACCCGACCAGCCCCCTTTTTCAAAAAAGGGGAAG-CTAAAATTGGA	50
A.g ₁	120	GTTCGGAAGACCAAAAAATTGTGTTTTCTTGACAGGAACGAA	161
A.p	49	GTTCTG-AGATCAAAAAAATGTGTTTTCTTGACAGGACCGAA	9

علاوه بر محققینی که توالی *HindIII* SatDNA را در تاسماهیان بررسی کردند برخی از محققین نیز تعداد جایگاه اشغال شده توسط این DNA ماهواره ای را در کروموزومهای تعدادی از تاسماهیان از جمله تاسماهی دریاچه ای، تاسماهی پوزه کوتاه، تاسماهی سفید، تاسماهی سبیری، تاسماهی آدریاتیک، تاسماهی روسی، فیلماهی و ماهی استرلیاد بررسی نمودند.

طبق بررسیهای انجام شده توسط Lanfrdi و همکاران (۲۰۰۱) تعداد نقاط رنگی حاصل از هیبریداسیون SatDNA با *HindIII* کروموزومهای تاسماهی آدریاتیک در ۱۶ عدد متافاز بررسی شده 50 ± 4 عدد (۸ کروموزوم اکروسانتريک بزرگ و کروموزومهای کوچک)، در ۷ متافاز بررسی شده تاسماهی روسی 80 ± 4 عدد (کروموزومهای متوسط - کوچک)، ۱۸ متافاز بررسی تاسماهی سبیری 38 ± 3 عدد (۸ اکروسانتريک بزرگ، کروموزومهای کوچک)، ۱۴ متافاز بررسی شده تاسماهی سفید 60 ± 4 عدد (کروموزومهای متوسط - کوچک)، ۲۰ متافاز بررسی شده ماهی استرلیاد ۸ عدد (۲ متاسانتريک متوسط، ۴ اکروسانتريک بزرگ، ۲ متاسانتريک کوچک) و ۸ متافاز بررسی شده فیلماهی ۸ عدد (۲ متاسانتريک متوسط، ۲ اکروسانتريک بزرگ، ۴ متاسانتريک کوچک) گزارش شد. تعداد نقاط مذکور در تاسماهی دریاچه ای نیز ۴۹ عدد (Fontana et al., 2004) و تاسماهی پوزه کوتاه ۱۴ عدد گزارش شد (جدول ۱۷).

جدول ۱۲- تعداد متافازهای بررسی شده، تعداد علائم شمارش شده

در متافازها و نوع کروموزومها در تاسماهیان

گونه ها	تعداد متافازهای بررسی شده	تعداد علائم شمارش شده در متافازها	نوع کروموزومها	منبع
تاسماهی آدریاتیک	۱۶	۵۰±۴	۸ کروسانتريک بزرگ، کروموزومهای کوچک	Lanfredi et al., 2001
تاسماهی روسی	۷	۸۰±۴	کروموزومهای متوسط - کوچک	
تاسماهی سبیری	۱۸	۳۸±۳	۸ کروسانتريک بزرگ، کروموزومهای کوچک	
تاسماهی سفید	۱۴	۶۰±۴	کروموزومهای متوسط - کوچک	
ماهی استرلیاد	۲۰	۸	۲ متاسانتريک متوسط، ۴ کروسانتريک بزرگ، ۲ متاسانتريک کوچک	
فیلماهی	۸	۸	۲ متاسانتريک متوسط، ۲ کروسانتريک بزرگ، ۴ متاسانتريک کوچک	
تاسماهی اروپا	۱۲	-	-	
تاسماهی دریاچه ای		۴۹		Fontana et al., 2004
تاسماهی پوزه کوتاه	-	۱۴	-	Fontana et al., 2007

در این تحقیق تعیین دقیق نوع کروموزومها و محل قرار گرفتن *HindIII* SatDNA بر روی کروموزومهای ماهیان مورد آزمایش میسر نشد.

علت اختلاف تعداد نقاط رنگی مشاهده بر روی کروموزومهای تاسماهی روسی در این تحقیق با نتایج کسب شده توسط Lanfredi و همکارانش (۲۰۰۱) دلایل مختلفی می تواند داشته باشد که شاید یکی از دلایل آن متفاوت بودن روش کار باشد. در تحقیق حاضر برای نشاندار کردن پروب مورد استفاده از روش Nick translation استفاده شد لذا بدین منظور پروب مورد نظر با ماده Spectrum orange (Orange-dUTP) به روش Nick translation نشاندار شد سپس با کروموزومهای ماهیان مورد آزمایش هیبرید گردید و بلافاصله با ماده DAPI رنگ آمیزی ثانویه (Counterstain) گردیدند. در نتیجه علائم حاصل از هیبریداسیون پروب با کروموزومهای ماهیان مورد آزمایش با میکروسکوپ فلوروسنس بصورت نقاط صورتی رنگ قابل رویت گردیدند. در حالیکه Lanfredi و همکارانش (۲۰۰۱) ابتدا پروب مورد استفاده را با ماده Digoxigenin و با استفاده از روش PCR نشاندار نموده، سپس آن را با کروموزومهای ماهیان مورد آزمایش هیبرید نمودند. این محققین به منظور قابل

رویت نمودن پروبهای هیبرید شده با کروموزومهای ماهیان مورد آزمایش از روش ایمنوشیمیایی استفاده نمودند یعنی ابتدا ماده anti-dioxigenin که در واقع آنتی بادی ماده Digoxigenin است به نمونه افزوده و پس از رنگ آمیزی ثانویه نمونه با ماده PI(Propidium iodide) محل قرارگرفتن پروبها بر روی کروموزومها را قابل رویت نمودند.

همانطوریکه ذکر شد مشخص نمودن نوع کروموزومها و محل دقیق قرارگرفتن پروب استفاده شده در این تحقیق بر روی کروموزومهای ماهیان مورد آزمایش میسر نشد که دلایل آن را می توان کوچک بودن اندازه کروموزومها، وجود میکروکروموزومها، بزرگ بودن و نامشخص بودن شکل نقاط رنگی حاصل از هیبریداسیون پروب با کروموزومها را مطرح نمود. Lanfredi و همکارانش (۲۰۰۱) در تحقیق خود در مورد تاسماهی روسی صرفاً به تعداد و اندازه کروموزومهای حاوی SatDNA خویشاوندی تاسماهیان اشاره نمودند. Fontana و همکارانش (۲۰۰۴) نیز در تحقیق خود درباره تاسماهی پوزه کوتاه فقط به تعداد کروموزومهایی که جایگاه HindIII SatDNA بودند اشاره کردند. این محققین نیز نامشخص بودن شکل و اندازه نقاط رنگی مستقر بر روی کروموزومها را از دلایل مشکل بودن تعیین مکان دقیق استقرار پروب مورد استفاده بر روی کروموزومهای ماهی مذکور عنوان نمودند. همچنین Fontana و همکاران (۲۰۰۷) در تحقیقات خود در ارتباط با بررسی SatDNA مذکور در تاسماهی دریاچه ای تنها به ذکر تعداد نقاط رنگی مشاهد شده در کروموزومهای این ماهی بسنده نمودند.

دستاوردهای پروژه

از دستاوردهای این تحقیق می توان به موارد ذیل اشاره نمود:

۱- جداسازی SatDNA خویشاوندی تاسماهیان از ژنوم تاسماهی ایرانی، تعیین و ثبت توالی آن در بانک ثبت ژن NCBI با کد (FJ429174).

۲- جداسازی SatDNA خویشاوندی تاسماهیان از ژنوم تاسماهی روسی، تعیین و ثبت توالی آن در بانک ثبت ژن NCBI با کد (FJ594465).

۳- بکارگیری روشهای کلونینگ و بومی سازی تهیه پروب برای انجام آزمایشات FISH در بخش ژنتیک انستیتو تحقیقات بین المللی تاسماهیان دکتر دادمان.

۴- بدست آوردن روش کشت خون تاسماهی روسی و بدست آوردن گسترشهای کروموزومی مناسب از این ماهی. با دستیابی به روش کشت خون تاسماهی روسی کشت خون ۶ گونه تاسماهی موجود در دریای خزر تکمیل شد. با توجه به انجام موفقیت آمیز قبلی کشت خون دو رگه های حاصل از تلاقی تاسماهی ایرانی و فیل ماهی (بصورت رفت و برگشت) و دو رگه های حاصل از تلاقی فیلماهی و ماهی استرلیاد (ماهی Bester)، ترکیب محیط کشت مناسب برای کشت تاسماهیان دریای خزر و دو رگه های ذکر شده در بالا بدست آمد.

۵- بدست آوردن روش کار تکنیک FISH در مورد تاسماهی ایرانی و تاسماهی روسی، با دستیابی به این تکنیک در واقع فصل جدیدی در تحقیقات ژنتیک آبزیان کشور تحت عنوان "سیتوژنتیک مولکولی آبزیان" گشوده شد. با توجه به کاربرد وسیع و متنوع این تکنیک بدون شک در آینده می توان از آن برای تحقیقات ژنتیک سایر آبزیان بهره جست.

۶- ارائه مقاله در ششمین سمپوزیوم بین المللی ماهیان خاویاری (چین) تحت عنوان:

Chromosomal location of *HindIII* Satellite DNA family in *Acipenser persicus*

پیشنهاها

- ۱- با توجه به کاربرد وسیع تکنیک FISH در تحقیقات ژنتیک آبریان که قبلاً در این گزارش به آنها اشاره شد از این تکنیک برای تحقیقات ژنتیک سایر آبریان کشور استفاده گردد.
- ۲- با توجه به تجارب کسب شده در این تحقیق پیشنهاد می گردد تحقیقات ژنتیکی در مورد تفکیک دو گونه تاسماهی ایرانی و تاسماهی روسی با تاکید بر تحقیقات ژنتیک مولکولی با پیشنهاد و اجرای پروژه های جدید و بکارگیری تکنیکهای مختلف تا اثبات تفکیک گونه ای این دو ماهی ادامه یابد.

تشکر و قدر دانی

بدینوسیله از تمامی بزرگوارانی که در طول انجام این پروژه ما را یاری نمودند از جمله:

جناب آقای دکتر عباسعلی مطلبی ریاست محترم موسسه تحقیقات شیلات ایران، همچنین جناب آقای دکتر مصطفی شریف روحانی معاون محترم پژوهشی و جناب آقای دکتر احمد غرقی مدیر محترم بخش بیوتکنولوژی موسسه تحقیقات شیلات ایران بخاطر پشتیبانی علمی، مالی و تامین تجهیزات مورد نیاز این پروژه، استاد ارجمند آقای دکتر بهرام کاظمی و سرکار خانم مریم جهانی کارشناس محترم مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی دانشگاه شهید بهشتی بخاطر همکاری در تهیه پروب تاسماهی روسی، سرکار خانم فروزنده محجوبی مدیر محترم گروه ژنتیک پزشکی پژوهشکده ملی مهندسی ژنتیک و فناوری زیستی بخاطر ارائه مشاوره علمی در طول انجام این طرح و خانم لیلا عزیززاده پرمهر کارشناس محترم بخش ژنتیک انستیتو تحقیقات بین المللی ماهیان خاویاری دکتر دادمان بخاطر همکاری مستمر در تهیه پروب تاسماهی ایرانی، همچنین از همکاری صمیمانه آقای دکتر حمید گورابی رییس محترم پژوهشکده **رویان** جهاد دانشگاهی به خاطر استفاده از امکانات و از آقای حامد وزیری نصب کارشناس محترم گروه ژنتیک پژوهشکده رویان بخاطر همکاری در انجام آزمایشات FISH سپاسگزاری می گردد

همچنین از تمامی همکاران خود در انستیتو تحقیقات بین المللی ماهیان خاویاری دکتر دادمان که در انجام این پروژه ما را یاری دادند از جمله :

جناب آقای دکتر محمد پورکاظمی رییس محترم انستیتو تحقیقات بین المللی ماهیان خاویاری دکتر دادمان بخاطر همکاری فنی و تخصصی، همچنین پیگیری موضوعات مربوط به تصویب طرح، تامین تجهیزات و ملزومات ضروری طرح، جناب آقای دکتر محمود بهمنی معاون محترم پژوهشی و جناب آقای اسماعیل شعبانی معاون محترم اداری و مالی، مسئول محترم طرح و برنامه، مسئول و همکاران محترم بخش مالی و ترابری انستیتو به خاطر فراهم نمودن تسهیلات لازم به منظور انجام بهینه طرح، مسئولین و کارشناسان محترم بخشهای تکثیر و پرورش بخاطر پرورش ماهیان مورد آزمایش و همکاری در خونگیری از ماهیان مورد آزمایش، اکولوژی، بهداشت و بیماریهای آبزیان بخاطر استفاده از برخی تجهیزات موجود در آن بخش ها، بخش ارزیابی ذخایر بخاطر در اختیار گذاشتن آمار و اطلاعات مربوط به صید و بهره برداری ماهیان خاویاری، اطلاعات علمی و در نهایت از کارشناسان و همکاران محترم بخش ژنتیک انستیتو تشکر و قدردانی می گردد.

منابع

- قرایی، ا.، ۱۳۸۰. تشخیص مولکولی دو گونه تاسماهی ایرانی *Acipenser persicus* و تاسماهی روسی *Acipenser gueldenstaedtii* با استفاده از روش RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA). پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشکده منابع طبیعی کرج، دانشگاه تهران، ۱۰۹ صفحه.
- بهمنی، م.، ۱۳۷۷. بررسی فیلوژنیک و سیستماتیک تاسماهیان خون، مجله علمی شیلات ایران، شماره ۲، سال هفتم، صفحه ۳۰-۹.
- کیوان، ا.، ۱۳۸۲. ماهیان خاویاری ایران. انتشارات نقش مهر، ۴۰۰ ص.
- نصری چاری، ع.، ۱۳۷۲. بررسی مقایسه ای پارامترهای مورفوبیولوژیک چالباش و قره برون سواحل جنوبی دریای خزر در جهت نظریه استقلال قره برون به عنوان گونه تاسماهی ایرانی (*Acipenser persicus*). پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشکده منابع طبیعی کرج، دانشگاه تهران، ۱۲۷ صفحه.
- نوروزفشخامی، م. ر. و خسروشاهی، م.، ب ۱۳۷۴. مطالعه کروموزومی ماهیان خاویاری از طریق کشت گلبولهای سفید خون، مجله علمی شیلات ایران، شماره ۲، سال چهارم، صفحه ۷۱-۶۳.
- نوروزفشخامی، م. ر.، ۱۳۸۴. بررسی اثرات فیتو هماگلوتینین (PHA-P) و لیوپلی ساکارید (LPS) جدا شده از باکتری *E. coli* بر کشت لکوسیتهای ماهی شپ *Acipenser nudiventris* به منظور کاربوتایپ. پایان نامه کارشناسی، دانشگاه آزاد واحد تهران شمال، ۹۶ صفحه.
- Amores, A., Giles, V., Thode, G. and Carmen Alvarez, M., 1990. Adaptive character of a Robertsonian fusion in chromosomes of the fish *Gobius paganellus* (Pisces, Perciformes). *Heredity*, 65: 151-155.
- Aranson, U; Gretarsdottir, S; Widegren, B., 1992. Mysticete (baleen whale) relationship based upon the sequence of the common cetacean DNA satellite. *Mol Biol Evol* 9:1018-1028.
- Arefiev, V. A., 1983. Polykaryogram analysis of ship, *Acipenser nudiventris* Lovetsky (Acipenseridae, Chondrostei). *Vopr. Ichthyol*, 23: 209-216.
- Arefiev, V. A., 1989. Karyotype variability in successive generations after hybridization between the great sturgeons *Huso huso* (L). And the starlet *Acipenser ruthenus* (L). *J. Fish. Boil.* 35, 819-828.
- Arefiev, V. A., 1991. Different rate of intrapopulation chromosome polymorphism in two species of Black Sea blennies (Blennidae, Pisces). *Genetica*, 83:181-187.
- Arefiev, V. A.; Nikolaev, A. I., 1991. Cytological analysis of the reciprocal hybrids between low-and high-chromosome Acipenserids, the great sturgeon, *Huso huso* (L.), and the Russian sturgeons, *Acipenser gueldenstaedtii* Brandt. *Cytologia*. 56, 495-502.
- Arlati, G.; Belysheva, L. A.; Kaidanova, T. I., 1995. Karyological analysis of *Acipenser naccarii* (Bonapart). *Proc. Intern. Sturg. Symp.*, VNIRO, 119-123.
- Artyukhin, E. N., 1974. On the Status of Late Spring Sturgeon in the Volga River, in Abstracts of Account Session TSNIORKh Dedicated to the 10th Anniversary of the Institute , pp. 7-9.
- Artyukhin, E. N., 1979. The Persian Sturgeon in North Caspian Rivers and Perspectives of Its Use in Sturgeon Fisheries, in Biological Foundations of Sturgeon Management in the Water Bodies of the USSR, pp. 105-115.

- Birstein, V. J. and Vasiliev, V. P., 1987. Tetraploid -Octaploid relationships and karyological evolution in order Acipenseriformes (Pisces). *Genetica*, 72: 3-12.
- Birstein, V. J. and DeSalle, R., 1998. Molecular Phylogeny of Acipenserinae. *Mol. Phylogenet. Evol.*, No. 9, 141-145.
- Birstein, V. J ; Doukakis, P and DeSalle, R., 2000. Polyphyly of mtDNA lineages in the Russian sturgeon, *Acipenser gueldenstaedtii*: Forensic and Evolutionary Implications. *Conservation Genetics*, 1: 81-88.
- Birstein, V. J. and P. Doukakis., 2001. Molecular Identification of Sturgeon Species: Science, Bureaucracy, and the Impact of Environmental Agreements,” in *Monitoring Migratory Animals* (Publ. Fed. Agency for Nature Conservation (BfN), Bonn, 2001), pp. 47-63.
- Blackledge, K.H., and Bidwell, C.A. 1993. Three ploidy levels indicated by genome quantification in Acipenseriformes of North America. *J. Hered.* 84:427-430.
- Brodin, N. A., 1897. Materials on Sturgeon Biology, Tr.Otdela Ichthyol. Akad. Nauk 2, 261-272 .
- Burtzev, J. A., Nikoljukin, J.; Serebryakova, E. V., 1976. Karyology of the Acipenseridae family in the relation to the hybridization and taxonomy problems. *Acta Biol. Jugosl. Ser. Ichthyologia* 8, 27-34.
- Capriglione, T., Morcskalchi, A., Olmo, E., Rocco, L. and Stingo, V., 1994. Satellite DNAs, heterochromatin and sex chromosomes in *Chionodraco haroatus* (Channichthyidae, Periformes). *Polar BioI.* 14:284-290.
- De La Herran, R., Fontana, F., Lanfredi, M., Congiu, L., Leis, M., Rossi, R., Ruiz Rejon, C., Ruiz Rejon, M. and Garrido-Ramos, M.A., 2001. Slow rates of evolution and sequence homogenization in an ancient satellite DNA family of sturgeons. *JOURNAL Mol. Biol. Evol.* 18(3), 432-436.
- Devlin, R. H., McNeil, B. K., Groves, T. D. D., and Donaldson, E. M., 1991. Isolation of a Y-chromosomal DNA probe capable of determining genetic sex in chinook salmon. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 48: 1606-1612.
- Devlin, R. H., McNeil, B. K., Solar, I. I. and Donaldson, E. M., 1994. A rapid PCR-based test for Y -chromosomal DNA allows simple production of all-female strains of chinook salmon. *Aquaculture*, 128:211-220.
- Dingercus, G and Howell, W. M. 1976. Karyotypic analysis and evidence of tetra ploidy in the North American paddle fish, *polydon spatula*. *Scinece* 1974: 842- 844.
- Fontana, F and Colombo, G. 1974. The chromosomes of Italian sturgeons. *Experientia* 30. 739-742.
- Fontana, F.; Jankovic, D.; Zivkovic, S., 1975. Somatic chromosome of *Acipenser ruthenus* L. *Arch. Boil. Nauka, Beograd* 27, 33-35.
- Fontana, F., 1994. Chromosomal nucleolar organizer regions in four sturgeons Species as markers of karyotype evolution in Acipenseriformes (Pisces).
- Fontana, F.; Lanfredi, M.; Rossi, R.; Bronzi, P.; Arlati, G., 1995. Established cell lines from three sturgeon species. *Sturg. Quart.* 3, 6-7.
- Fontana, F.; Lanfredi, M.; Rossi, R.; Bronzi, P.; Arlati, G., 1996. Karyotypic characterization of *Acipenser gueldenstaedtii* with C-, AgNO₃, and fluorescence banding techniques. *Ital. J. Zool.* 63, 113-118.
- Fontana, F.; Rossi, R.; Lanfredi, M.; Arlati, G.; Bronzi, P., 1997. Cytogenetic characterization of cell lines from three sturgeon species. *Caryologia* 50, 91-95.
- Fontana, F.; Tagliavini, J.; Congiu, L.; Lanfredi, M.; Chicca, M.; Laurenti, C.; Rossi, R., 1998a. Karyotypic characterization of the great sturgeon, *Huso huso* by multiple staining techniques and fluorescent in situ hybridization. *Mar. Biol.* 132, 495-501.
- Fontana, F.; Lanfredi, M.; Chicca, M.; Congiu, L.; Tagliavini, J.; Rossi, R., 1999. Fluorescent in situ hybridization with rDNA probes on chromosomes of *Acipenser ruthenus* and *Acipenser naccarii* (Osteichthyes Acipenseriformes). *Genome* 42, 1008-1012.
- Fontana, F., Bruch, R. M., Binkowski, F. P., Lanfredi, M ; Chicca, M ; Beltrami, N and Congiu, L., 2004. Karyotype characterization of the lake sturgeon, *Acipenser fulvescens* (Rafinesque 1817) by chromosome banding and fluorescent in situ hybridization *Genome: Vol.47*, 742-746.
- Fontana, F., Lanfredi, M., Kirschbaum, F., Garrido-Ramos, M.A., Robles, F., Forlani, A., and Congiu, L. 2007. Comparison of karyotypes of *Acipenser oxyrinchus* and *A. sturio* by chromosome banding and fluorescent insitu hybridization. *Genetica*. In press. Doi: 10.1007/s10709-007-9171-4, PMID: 172624498.
- Fontana, F.; Congiu, L.; Mudrak, V. A. ; Quattro, J. M. ; Smith, T.I.J. ; Ware, K and Dorshov, S.L., 2008. Evidence of hexaploid karyotype in shortnose sturgeon. *J.Genome Vol. 51*, 113-119.
- Fujiwara, A., Nishida-Umehara, C., Sakamoto, T., Okamoto, N., Nakayama, I. and Abe, S., 2001. Improved fish lymphocyte culture for chromosome preparation. *Genetica*, 111: 77-89.

- Garrido-Ramos M. A, Soriguer MC, De la Herran R et al., 1997. Morphometric and genetic analysis as proof of the existence of two sturgeon species in the Guadalquivir River. *Mar Biol* 129: 33-39.
- Garrido-Ramos M. A., Jamilena, M., Lozano, R., Ruiz Rejon, C. and Ruiz Rejon, M., 1994. Cloning and characterization of a fish centromeric satellite DNA. *Cytogenet. Cell Genet.*, 65: 233-237.
- Haaf, T., Schmid, M., Steinlein, C., Galetti, P. M., gr. And Wilard, H. F., 1993. Organization and molecular cytogenetics of a satellite DNA family from *Hoplias malabaricus* (Pisces, Erythrinidae). *Chromosom Res.*, 1:77-86.
- Hartley, S. E., and Davidson, W. S., 1994. Characterization and distribution of genomic repeat sequences from Arctic charr (*Salvelinus alpinus*). In: A. R. Beaumot, (Editor), *Genetics and Evolution of Aquatic Organisms*. Chapman and Hall, London, PP. 271-280.
- Hedrick, R. P.; McDowell, T. S.; Rosemarck, R.; Aronstein, D.; Lannan, C. N., 1991. Two cell lines from white sturgeon. *Trans. Am. Fish Soc.* 120, 528-534.
- Holcik, J., 1989. The freshwater fishes of Europe, Vol I/II. General Introduction to fishes *Acipenseriformes* Aula-Verlag Wiesbaden 468: 342-362.
- Klinkhardt, M.B., 1993. Cytogenetics of the herring (*Clupea harengus* L.) 2 karyotypes of White Sea herring groups. *Cytobios*, 75:149-156.
- Lanfredi, M; Congiu, L; Garrido – Ramos, M. A ; de la Herran, R. ; Leis, M.; Chicca, M ; Rossi, R ; Tagliavini, J ; Ruiz Rejon, M. and Fontana, F., 2001. Chromosomal location and evolution of a satellite DNA family in seven sturgeon species.
- Lukyanenko, V. I., 1973. Intraspecies Differentiation in Sturgeon and Its Significance for Rational Fisheries, in Abstracts of the Account Session of TSNIORKh, pp. 53–56.
- Mitrofanov, V. P. ; Dukravets, G. M. and Peseridi, N. E., 1986. The Fishes of Kazakhstan (Nauka, Alma-Ata, 1986) [in Russian].
- Mugue, N. S. ; Barmintseva, A. E. ; Rastorguev, S. M ; Mugue, V. N and Barmintsev, V. A., 2008. Polymorphism of the Mitochondrial DNA Control Region in Eight Sturgeon Species and Development of a System for DNA-Based Species Identification. *Genetika* : Vol. 44, No. 7, pp. 913–920.
- Nakayama, I., Foresti, R., Tewari, R., Schartl, M. L. and Chourrout, D., 1994. Sex chromosome polymorphism and heterogametic males revealed by two cloned DNA probes in the ZW/zz fish *Leporinus elongatus* *Chromosoma*, 103:31-39.
- Nanda, L., Feichtinger, W., Schmid, M., Schroder, J. H., Zischler, H and Epplen, J. T., 1990. Simple repetitive sequences are associated with the differentiation of the sex chromosomes in the guppy fish. *G. Mol. Evol.*, 30: 456-462.
- Nowruzfashkhami, M. R., 1996. On the karyotypes of *Acipenser persicus*, *Acipenser stellatus* and *Huso huso* from the Iranian waters of the Caspian sea. *Sturg. Quart.* 4, p. 7.
- Nowruzfashkhami, M. R.; khosroshahi, M., 1999. Karyotype study on stellate and great sturgeon by leukocyte culture. *J. Appl. Ichthyol.* 15, 283.
- Nowruzfashkhami, M. R; Pourkazemi, M and Baradarannoveiri, S., 2000. Chromosome study of Persian Sturgeon. *Acipenser persicus* B. *Cytologia*, 65, 197-202.
- Nowruzfashkhami, M. R; Safaïian, S.; Bahmani, M.; Chubian, F., 2006. Karyotype analysis in ship sturgeon *Acipenser nudiiventris* in the south Caspian Sea using leukocyte culture. *J. Appl. Ichthyol.* 22, 97-98.
- Ohno, S.; Muramoto, J.; Stenius, C.; Christian, L.; Kitterell, W. A., 1969. Microchromosomes in holocephalian, chondrosteian and holostean fishes. *Chromosoma* 226, 35-40.
- Pendas, A.M., Morna, P., and Garcia-Vazquez, E., 1993a. Ribosomal RNA genes are interspersed throughout a heterochromatic chromosome arm in Atlantic salmon. *Cytogenet. Cell Genet.*, 63: 128-130.
- Phillips, R. B., and Reed, M. R., 1996. Application of Fluorescence in situ hybridization (FISH) techniques to fish genetics. *Aquaculture*, 140:197-216.
- Pourkazemi, M., Skibinski, D.O.F and Beardmore, J. A., 2000. A Preliminary Study on Phylogenetic Relationship between Five Sturgeon Species in the Iranian Coastline of the Caspian Sea. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*. 2(1), 1-12.
- Putilina, L. A., 1983a. "Morphological Characteristics of the Persian Sturgeon from the Volga River," in *Integrated Use of Biological Resources of the Caspian and Azov Seas* (Moscow, 1983a), pp. 70–71.
- Rab, P., 1986. A note on the karyotype on the starlet, *Acipenser ruthenus* (Pisces, Acipenseridae). *Folia Zool.* 35, 73-78.
- Rezvani Gilkolaei, S., 1997. Molecular population genetic studies of sturgeon species in the south Caspian Sea. Ph.D thesis, School of Biological sciences University of Wales, Swansea. Pp.196.

- Robles, F., de la Herran, R., Ludwig, A., Ruiz Regon. C., Ruiz Rgon., M and Garrido-Ramos, M. A. 2004. Evolution of ancient satellite DNAs in sturgeon genome. *Gene*, 338:133-142. doi:10.1016/j.gene. 2004.06.001.PMID:15302414.
- Rubana, G. I. ; Kholodova, M. V. ; Kalmykovb, V. A. and Sorokin, P. A., 2008. Morphological and Molecular Genetic Study of the Persian Sturgeon *Acipenser persicus* Borodin (Acipenseridae). *J. Ichthyology*: Vol. 48, No. 10, pp. 891–903.
- Sokolov, L.I.; Vasilieve, V. P. 1989. *Acipenser nudiventris* Lovetsky, 1928 in the freshwater fishes of Europe.Vol 1/II. General introduction to fishes Acipenseriformes. J. Holcik (Ed.). Wiesbaden. P. p. 2006-220.
- Sola, I.; Cordisco, C.; Bressanello, S.; Cataudella, S., 1994. Cytogenetic characterization of the North American white sturgeon *Acipenser transmontanus* (Pisces, Acipenseridae). *Proc. VIII Congr. SEI*, pp. 64-65.
- Suciu, R.; Ene, C., 1996. Karyological study of the stellate sturgeon, *Acipenser stellatus*, from the Danube River. *Sturg. Quart.* 4, 14-15.
- Tagliavini, J., P. Williot, L. Congio, M. Chicca, M. Lanfredi, R. Rossi, and F. Fontana. 1999b. Molecular cytogenetic analysis of the karyotype of the European Atlantic sturgeon, *Acipenser sturio*. *Heredity* 83: 520-525.
- Turner, B.J. Grudzien. T.A. Adkisson, K.P. and Worrell. R.A., 1985. Extensive chromosomal divergence within a single river basin in the goeidid fish, *Ilyodon furcidens*. *Evolution*. 39: 122-134.
- Van Eenennaam, A. L.; Murray, J. D.; Medrano, J. F., 1999. Karyotype of the American green sturgeon. *Trans. Am. Fish. Soc.* 128, 175-177.
- Van Eenennaam, A. L.; Murray, J. D.; Medrano, J. F., 1998a. Mitotic analysis of the North American white sturgeon, *Acipenser transmontanus* Richardson (Pisces, Acipenseridae), a fish with a very high chromosome number. *Genome* 41, 266-271.
- Vasiliev, V. P.; Sokolov, L. I.; Serebryakova, E. V., 1980. Karyotype of the Siberian sturgeon *Acipenser baerii* Brandt from the Lena River and some questions of the Acipenserid karyotypic evolution. *Vopr. Ichthyol.* 23, 814-822.
- Yu, X.; Zhou, T.; Li, K.; Li, Y.; Zhou, M., 1987. On the karyosystematics of cyprinid fishes and a summary of fish chromosome studies in China. *Genetica* 72, 225-236.

Abstract

Location of family Satellite DNA (*Hind*III SatDNA) on chromosomes of *Acipenser persicus* and *Acipenser gueldenstaedtii* was analyzed using Fluorescent In Situ Hybridization (FISH) technique to determine the genetic differences between these two species.

After obtaining suitable metaphase plates using leukocyte culture and *Hind*III SatDNA extraction from genome of the fish under study, extracted SatDNA from genome of *A. gueldenstaedtii* was used as a FISH probe. The probe was labeled with spectrum orange (Orange-dUTP) and hybridized with chromosomes of the fish under study.

Analysis of SatDNA sequences isolated from *A. persicus* and *A. gueldenstaedtii* showed the presence of 163bp for *A. persicus* and 168bp for *A. gueldenstaedtii*. In the study of metaphase plates 66±4 signals were detected from the hybridization of the probe used with chromosomes of *A. persicus* and 68±3 signals were detected from the hybridization of the probe with chromosomes of *A. gueldenstaedtii*. Due to presence of numerous microchromosomes and heterogenous and large hybridization signals, it was impossible to identify the precise position of signals on chromosomes.

The following results are worth mentioning:

1. Developing leukocyte culture method for *A. gueldenstaedtii* and completing it for all of the Caspian Sea sturgeons.
2. Developing a suitable culture medium for the Caspian Sea sturgeons.
3. Isolating sturgeons *Hind*III Satellite DNA family from *A. persicus* and *A. gueldenstaedtii*, determining sequences and registering the sequences in the NCBI gene bank (FJ429174; FJ 94465).
4. Developing a protocol for FISH technique in *A. persicus* and *A. gueldenstaedtii* which has opened a new era in aquaculture genetic studies entitled Molecular cytogenetics in the country. Considering its potential applications, this technique can be applied to other aquatic species.

Key words : Caspian Sea, *Acipenser persicus*, *Acipenser gueldenstaedtii*, Fluorescent In Situ Hybridization (FISH), *Hind*III SatDNA

This document was created with Win2PDF available at <http://www.daneprairie.com>.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.